

# Immobilisation von Enzymen auf sphärischen Polyelektrolytbürsten

## Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
im Fach Chemie der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der  
Universität Bayreuth

vorgelegt von  
**Björn Haupt**  
aus Graben-Neudorf

Bayreuth, 2005



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2001 bis Oktober 2003 am Polymerinstitut der Universität Karlsruhe (TH) durchgeführt und von November 2003 bis Juni 2005 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Bayreuth fortgesetzt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Dissertation eingereicht am: 08.06.2005

Wissenschaftliches Kolloquium: 23.11.2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. O. Meyer

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. M. Ballauff (Erstgutachter)

Prof. Dr. F. X. Schmid (Zweitgutachter)

Prof. Dr. K. Seifert (Vorsitzender)

Prof. Dr. P. Strohriegl



## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. M. Ballauff danke ich für die interessante Themenstellung, die Korrektur und sein Interesse an meiner Arbeit.

Bei allen Mitgliedern und Ehemaligen des Polymerinstituts möchte ich mich herzlich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit sowie die Hilfsbereitschaft bei Fragen aller Art bedanken. An dieser Stelle möchte ich mich bei Jürgen Blaul, Ines Pietsch, Ulrich Fehrenbacher, Jérôme Crassous, Li Li, Yu Mei, Nico Dingenouts, Sabine Rosenfeldt, Mushtaq Patel und Geeta Sharma bedanken, welche zahlreiche Aufgaben zur Aufrechterhaltung eines intakten Laborbetriebs übernahmen. Bei Marcus Rastätter und Thorsten Neumann bedanke ich mich für ihre Arbeit während ihrer Diplomarbeit. Weiter möchte ich mich bei meinen Vertiefungspraktikanten Jill Weber, Anja Gress, und Dominik Erhard für ihren Fleiß und ihren Einsatz bedanken.

Bei Alexander Wittemann möchte ich mich besonders für die langjährige Zusammenarbeit bedanken. Ferner gilt mein Dank an ihn für die Korrektur dieser Arbeit und für viele fruchtbare Diskussionen.

Unseren Sekretärinnen Manuela Winkler und Ilona Deger danke ich herzlich für den reibungslosen Ablauf aller Dienstgeschäfte und die prompte Erledigung aller anfallenden Arbeiten.

Herrn Dr. Horvath danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und seine Leistungen für die Planung des Neubaus und des Umzugs. Wolfgang Arbogast und Helena Hörig danke ich für ihre Hilfe bei Problemen aller Art und die Diskussion auch nicht-wissenschaftlicher Probleme. Herrn Kühn danke ich für die Konstruktion und Verbesserung neuer Ultrafiltrationsapparaturen, ohne die viele Ergebnisse dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wären.

Bei Karlheinz Lauterbach, Christa Bächer, Christine Thunig und Elisabeth Dünfelder möchte ich mich für die Zusammenarbeit in Bayreuth bedanken.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Freunden und besonders bei meiner Familie: meinen Großeltern, meinen Eltern und Geschwistern, sowie meiner Nichte und meinem Neffen, die mich immer unterstützt haben und ohne die ich nie so weit gekommen wäre.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Aufgabenstellung.....</b>	<b>6</b>
<b>III. Trägersystem und Enzyme .....</b>	<b>7</b>
III.1 Sphärische Polyelektrolytbürsten (SPB) .....	7
III.2 Enzyme.....	12
III.2.1 Glucoamylase .....	14
III.2.2 $\alpha$ -D-Glucosidase .....	16
III.2.3 $\beta$ -D-Glucosidase .....	16
<b>IV. Enzymadsorption .....</b>	<b>18</b>
IV.1 Adsorptionsexperimente.....	18
IV.1.1 Adsorption von Glucoamylase .....	20
IV.1.2 Adsorption von $\alpha$ -D-Glucosidase .....	21
IV.1.3 Adsorption von $\beta$ -D-Glucosidase .....	22
IV.2 Triebkräfte der Adsorption.....	23
IV.3 Ergebnisse der Adsorptionsexperimente.....	29
<b>V. Enzymkinetik.....</b>	<b>32</b>
V.1 Aktivitätsuntersuchungen mittels UV/VIS-Spektroskopie .....	32

V.1.1	Michaelis-Menten-Kinetik:	33
V.1.2	Glucoamylase	37
V.1.3	$\alpha$ -D-Glucosidase	42
V.1.4	$\beta$ -D-Glucosidase	44
V.1.5	Diskussion der Resultate	46
V.2.	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	49
V.2.1	Voruntersuchungen	49
V.2.2	Aktivitätsuntersuchungen	51
V.2.2	Ergebnisse und Diskussion	53
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
	<b>Summary.....</b>	<b>60</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>63</b>
VII.1	Synthese und Reinigung der Latices .....	63
VII.1.1	Chemikalien	63
VII.1.2	Synthese des Photoinitiators HMEM	64
VII.1.3	Zweistufenpolymerisation zur Darstellung der PS-co-HMEM-Kernlatices	65
VII.1.4	Photoemulsionspolymerisation zur Darstellung der Kern-Schale-Latices	68
VII.1.5	Immobilisation von Enzymen	72
VII.1.6	Reinigung der Latices	72
VII.2	Charakterisierung der Trägerpartikel .....	74



VII.2.1	Konduktometrische Titration	74
VII.2.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	75
VII.2.3	Zetapotential	76
VII.2.4	Scheibenzentrifuge	77
VII.3	Geräte und Untersuchungsmethoden .....	78
VII.3.1	Konduktometrische Titration	78
VII.3.2	Scheibenzentrifuge (DCP)	79
VII.3.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	80
VII.3.4	UV/VIS-Spektroskopie	81
VII.3.6	Aktivitätsmessungen	83
VII.3.7	Mikrokalorimetrie	85
VII.3.8	Zetapotentialmessung	92
VII.3.9	Bestimmung des Feststoffgehaltes	94
VII.4	Fehlerbetrachtung .....	94
<b>VIII.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>98</b>
<b>IX.</b>	<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>103</b>
	<b>Verzeichnis der Publikationen .....</b>	<b>105</b>

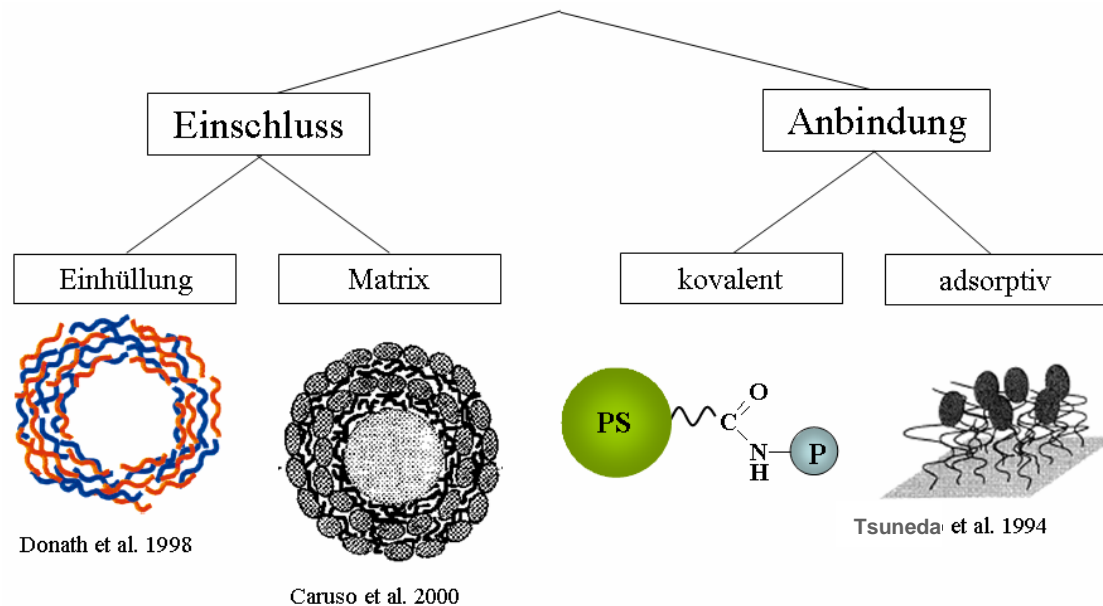


## I. Einleitung

Der Einsatz von Biomolekülen wie Proteinen, Antigenen/Antikörpern oder DNS ist von besonderem Interesse für Forschung und industrielle Anwendungen (Hartmeier 1986, Buchholz *et al.* 1997, Copeland 2000). Oft müssen diese zur Nutzung an Trägerpartikel gebunden werden, d.h. sie werden immobilisiert. Allgemein wird von Immobilisation gesprochen, wenn eine künstliche Einschränkung der Beweglichkeit der Biomoleküle vorliegt. (Hartmeier 1986). So werden in der Analytik die Genauigkeit und Sensibilität von Immunoassays durch Immobilisation von Antigenen/Antikörper auf Latexpartikeln, den so genannten Latexagglutinationsassays, erhöht (Kawaguchi 2000). Die verwendeten Biomoleküle sind oft nur in geringen Mengen verfügbar, d.h. ihr Einsatz ist daher sehr teuer. Im weiteren Verlauf sollen hier Enzyme betrachtet werden. Um ihre Verwendung rentabel zu machen, müssen diese nach der Umsetzung des Substrates am Ende des Zyklus zurückgewonnen bzw. die Reaktion kontinuierlich geführt werden (Dautz *et al.* 1995, Buchholz *et al.* 1997, Chow *et al.* 2004). Hierbei muss der Verlust an Enzym so gering wie möglich bleiben. Durch Bindung an Trägerpartikel werden so die Vorteile der heterogenen Katalyse erhalten, d.h. leichte Abtrennung der Katalysatoren vom Reaktionsgemisch und die Wiederverwendbarkeit des katalytischen Materials (Zanin *et al.* 1995). Gleichzeitig kann die Reaktion in wässriger Lösung durchgeführt werden.

Zur Erzeugung funktionalisierter Trägerpartikel steht eine Vielzahl unterschiedlicher Trägerpartikel wie z.B. Kolloidpartikel, Membranen oder Gele zu Verfügung (Dautz *et al.* 1995). Von Art und Beschaffenheit dieser ist die Vorgehensweise bei der Immobilisation teilweise stark abhängig. Es gibt zwei generelle Vorgehensweisen hierbei (s. Abb. I.1). Zum einen kann der Weg der Immobilisation durch Einschluss in Hohlkapseln (Caruso *et al.* 2000, Lvov *et al.* 2001) gewählt werden. Hier können beispielsweise aus Polystyrolsulfonat und Poly(Allyamin-Hydrochlorid) Hohlkapseln gebildet werden, in die Proteine eingeschlossen werden können (Donath *et al.* 1998, Balabushevitch *et al.* 2001). Ebenfalls zu dieser Kategorie der Immobilisation gehört der Einschluss in eine Matrix, dies können Membranen (Kacar *et al.* 2001, Saito *et al.* 2002) oder Gele (Tümtürk *et al.* 1999, Bahar *et al.* 2000) sein. Eine besondere Form des Einschlusses von Biomolekülen ist das Einbetten (*embedding*) dieser in Polyelektrolytschichten. Hier werden Proteine auf entgegengesetzt geladenen Polymeren adsorbiert. Die so erhaltene Enzymschicht wird wieder mit einer Schicht des

Polymers beschichtet. Der Vorgang wird mehrmals wiederholt bis mehrere Schichten aus Polymer und Protein vorhanden sind. Diese Vorgehensweise wurde von Decher *et al.* (1992, 1997) beschrieben. Die entstehende Struktur wird als Decher-Multischichten bezeichnet und findet Anwendung bei der Immobilisation von Enzymen (Lvov *et al.* 1996, 2001, Caruso *et al.* 2000, 2001).



**Abb. I.1:** Schematische Darstellung der Immobilisationsmöglichkeiten (Donath *et al.* 1998, Caruso *et al.* 2000, Tsuneda *et al.* 1994).

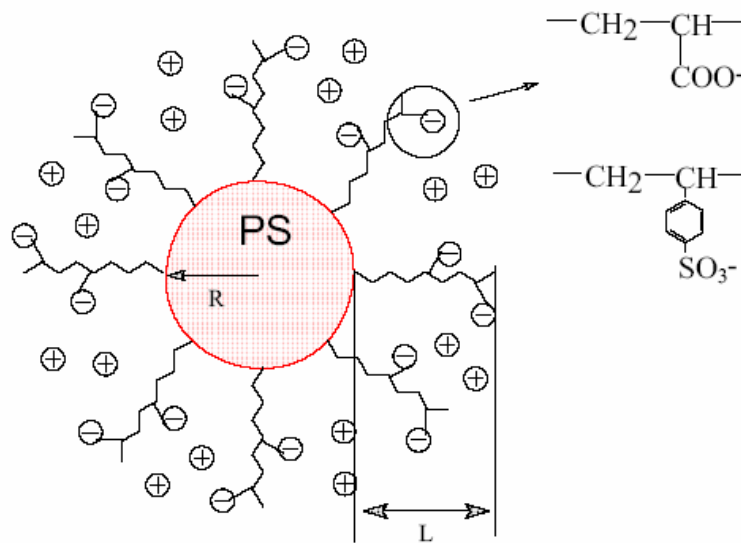
Die zweite Vorgehensweise ist die der Anbindung an Trägerpartikel. Dies kann z.B. kovalent erfolgen. Dabei werden durch Kupplungsreagenzien Biomoleküle mit den Trägerpartikeln verknüpft (Bahar *et al.* 1999, Siiman *et al.* 2001, Mateo *et al.* 2002). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Bindung von *pH*-Wert oder Ionenstärke unbeeinflusst bleibt (Arica *et al.* 1993, Bahar *et al.* 1999). Auch durch Adsorption können Biomoleküle angebunden werden, es ist dabei keine aufwändige Kupplungschemie notwendig. Oft ist eine Vermeidung der Adsorption bzw. das Ablösen von adsorbierten Biomolekülen von größerer Schwierigkeit (Ostuni 2001). Allerdings ist diese Adsorption meist reversibel und durch Änderung des *pH*-Wertes oder der Ionenstärke kann es wieder zur Desorption kommen (Arica *et al.* 1993). Dies kann zu einer Einschränkung ihrer Verwendbarkeit führen.

Für die Verwendbarkeit von immobilisierten Enzymen ist der Erhalt ihrer enzymatischen Funktion von entscheidender Bedeutung. Maß hierfür sind die kinetischen Parameter Michaelis-Konstante  $K_M$  und Wechselzahl  $k_{cat}$  (Copeland 2000). Diese werden aus der Analyse der gemessenen Daten nach der Michaelis-Menten-Kinetik erhalten. Durch

Immobilisation werden diese kinetischen Parameter verändert, zu meist wird  $K_M$  erhöht und  $k_{cat}$  abgesenkt (Arica *et al.* 1993, 1998, 2000, Oh *et al.* 2000). Ein Zuwachs des  $K_M$ -Wertes bedeutet, dass die Affinität des Substrates zum Enzym herabgesetzt wurde (Copeland 2000). Dies kann durch Konformationsänderungen des Enzyms oder durch zur Vergleichsmessung unterschiedliche Versuchsbedingungen verursacht werden. So spielt die Diffusion bei der Immobilisation durch Einschluss von Enzymen eine große Rolle für die Aktivität des Enzyms, wenn Poren bzw. Membranen vorhanden sind (Sun *et al.* 1999, Oh *et al.* 2000, Gonzalez-Saiz *et al.* 2001, van Roon *et al.* 2003). Die Größe des Substrates ist hier von entscheidender Bedeutung (Lee *et al.* 1980, Arica *et al.* 2000). Durch Diffusionshemmung der Substratzufuhr kann diese der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Auch der Abtransport des Produktes spielt eine Rolle, da eine Anreicherung an Produkt, die Enzymreaktion inhibieren kann. Werden Enzyme chemisch an Trägerpartikel gekuppelt, so können durch den Einsatz dieser Reagenzien diese in ihrer Aktivität herabgesetzt oder gar ganz deaktiviert werden. Grund hierfür sind Strukturänderungen oder eine Blockade des aktiven Zentrums durch die Anbindung (Tardioli *et al.* 2003). Durch das Fehlen von Kupplungsreagenzien ist die adsorptive Immobilisation geeigneter, da hier keine Deaktivierung von Enzymen durch kovalente Anbindung hervorgerufen wird. Allerdings kann es durch Wechselwirkung mit planaren Oberfläche zur Spreitung und damit Deformation der Biomoleküle kommen. Dies wurde z. B. von Czeslik *et al.* (2001) bei der Adsorption von Lysozym auf Silikatpartikeln beobachtet. Dadurch kann ein Verlust an Aktivität auftreten. *Embedding* von Proteinen ist hingegen eine schonende Methode für die Immobilisation von Proteinen. So zeigten Untersuchungen von Xia *et al.* (1997) an Koazervaten aus Poly(diallyldimethyl-Ammoniumchlorid) (PDADMAC) und Alkoholdehydrogenase bzw. Trypsin, dass ein Erhalt von  $K_M$  auftrat. Für die Immobilisation von Trypsin in Polykation/Polyanion-Komplexen erhielten Dautzenberg *et al.* (1997) einen Erhalt der enzymatischen Aktivität. Schwinté *et al.* (2001) beobachteten für *embedding* von Fibrinogen in Poly(Allyamin-Hydrochlorid) bzw. Polystyrolsulfonat Multischichten den Erhalt der Sekundärstruktur. Die Untersuchung der Konformation erfolgte hier mittels *Attenuated Total Reflectance-Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie* (ATR-FTIR)-Spektroskopie.

Wittemann *et al.* (2004) untersuchte die Adsorption von Protein auf sphärischen Polyelektrolytbürsten (SPB). Die Synthese dieser Trägerpartikel, die schematisch in Abb. I.2 dargestellt sind, wurde von Guo *et al.* (1999, 2000) entwickelt. Hier wurden Teilchen enger Größenverteilung durch eine Zweistufenemulsionspolymerisation dargestellt, in deren Schale durch Copolymerisation Photoinitiator eingebaut wurde. Mittels Photoemulsionspolymerisation kann aus wasserlöslichen Monomeren wie Acrylsäure (AA), einem schwachen Elektrolyten, oder Natrium-4-Vinyl-benzolsulfat (NaSS), einem starken Elektrolyten, eine Polyelektrolytschale aufgebaut werden. Es wird ein so genannter *brush*

erzeugt. Der Ausdruck *brush* bezeichnet eine Schicht von Polymerketten, die fest an eine Oberfläche geknüpft sind und deren benachbarten Ketten sich deutlich überlappen (Alexander *et al.* 1984, de Gennes 1978). Für Polyelektrolyte wird durch elektrostatische Abstoßung eine deutliche Streckung der Ketten erreicht. Dieser geladene *brush* kann durch das Daoud-Cotton-Modell beschrieben werden (Daoud *et al.* 1982, Halperin *et al.* 1992, Witten *et al.* 1986, Ligoure *et al.* 1990, Hariharan *et al.* 1998). Durch die Synthese können Kernradius  $R$ , Konturlänge der Polymerketten  $L_C$  und Oberflächendichte  $\sigma$  der Ketten durch die Synthesebedingungen variiert werden (Guo *et al.* 1999, 2000). Somit lassen sich Trägerpartikel mit definierter Morphologie gezielt synthetisieren.



**Abb. I.2:** Schematische Darstellung einer sphärischen Polyelektrolytbürste: An einen festen Polystyrolkern werden lineare anionische Polyelektrolytketten hoher Packungsdichte angeknüpft. Die Polyelektrolytschale ist entweder aus dem schwachen Elektrolyten Polyacrylsäure oder dem starken Elektrolyten Polystyrolsulfonat aufgebaut (Guo *et al.* 2001).

Auf diese Trägerpartikel konnten große Mengen an Protein adsorptiv gebunden werden. Die adsorbierte Menge konnte durch auf Langmuir-Freundlich- und Brunauer-Emmet-Teller (BET)-Theorie basierende Ausdrücke beschrieben werden. Im Gegensatz zu den zugrunde liegenden Theorien wird hier nicht von einem Gleichgewichtszustand ausgegangen (Wittemann *et al.* 2003). Triebkraft dieser Adsorption ist die so genannte *counterion release force* (Fleck *et al.* 2001, Meier-Koll *et al.* 2004). Konformationsänderungen als Triebkraft wurden für *annealed brushes* ausgeschlossen, da Circular dichroismus- (CD) und Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) zeigten, dass die Sekundärstruktur für adsorbierte Ribonuklease A (RNase A) und Rinderserum Albumin (BSA) erhalten blieb (Wittemann *et al.* 2004). Der Erhalt der Sekundärstruktur ist eine wichtige Voraussetzung für den Erhalt der enzymatischen Aktivität. Mittels Untersuchungen durch Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

konnte gezeigt werden, dass sich die Proteine innerhalb des *brush* befinden (Rosenfeldt *et al.* 2004). Somit kann in diesem Fall alternativ von einem *embedding* der Proteine gesprochen werden. In Verbindung mit den hohen Mengen an immobilisierbarem Protein, der Möglichkeit die Morphologie der Partikel gezielt einzustellen und dem Erhalt der Sekundärstruktur für BSA und RNase A bei der Adsorption auf *annealed brushes* sollten sich diese Partikel als ausgezeichnete Trägermaterialien für die Immobilisation von Enzymen eignen.

## II. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit sollte die Darstellung mit Enzym beladener Trägerpartikel und Bestimmung der enzymatischen Aktivität sein.

Als Trägerpartikel sollten *annealed* und *quenched brush*-Systeme verwendet werden. Hierfür sollten diese zuerst synthetisiert und charakterisiert werden. Die Synthese der Kerne sollte mittels Emulsionspolymerisation erfolgen. Der Aufbau der Schale sollte durch eine *grafting from*-Technik mittels Photoemulsionspolymerisation erreicht werden. Als Charakterisierungsmethoden sollten Zetapotential, konduktometrische Titration, Scheibenzentrifuge und dynamische Lichtstreuung verwendet werden.

Die Immobilisation von Enzymen sollte mittels Adsorption auf SPB erreicht werden. Als Enzyme sollten Glucoamylase,  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucosidase verwendet werden. Die adsorbierte Menge sollte mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt werden und die so experimentell erhaltenen Adsorptionkurven durch ein Modell angepasst werden. Die Ergebnisse für verschiedene Enzyme und *brush*-Systeme sollten miteinander verglichen werden.

Für die so immobilisierten Enzyme sollten eine Nachweismethode gefunden werden und die Enzymkinetik mittels UV/VIS-Spektroskopie und isothermer Titrationskalorimetrie bestimmt werden. Die so erhaltenen enzymkinetischen Parameter  $K_M$  und  $k_{cat}$  sollten für verschiedene Enzyme, Beladungsgrade und *brush*-Systeme miteinander verglichen werden.

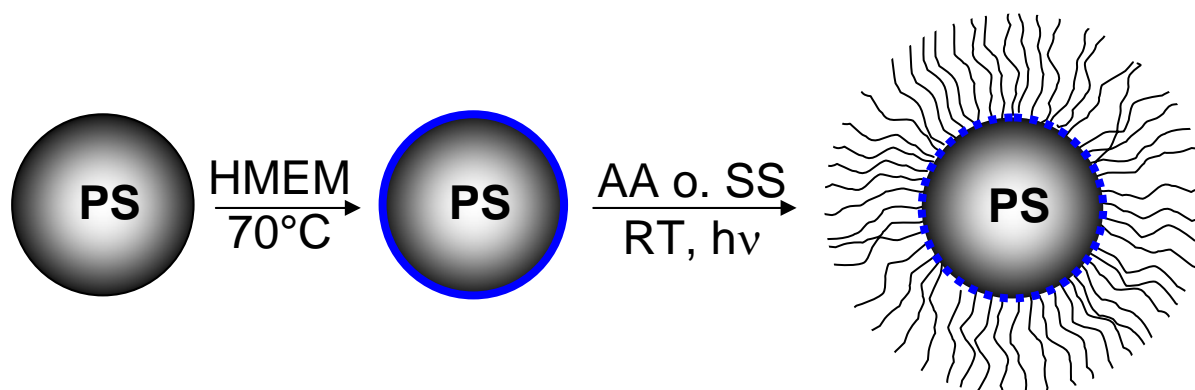


### III. Trägersystem und Enzyme

#### III.1 Sphärische Polyelektrolytbürsten (SPB)

Sphärische Polyelektrolytbürsten (*spherical polyelectrolyte brushes*, SPB) sind kolloidale Partikel, die aus einem Polystyrolkern und einer dicht gepackten Polyelektrolytschicht bestehen. Eine schematische Darstellung ist in Abb. I.2 gezeigt (Guo *et al.* 2001).

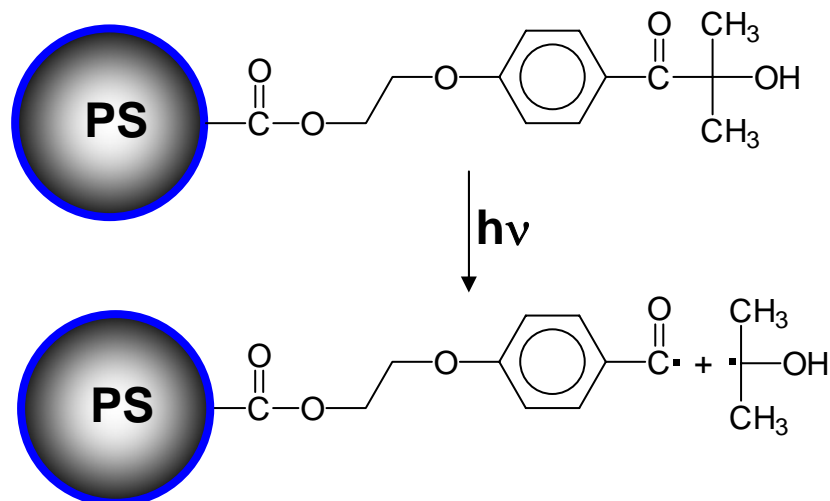
Die in dieser Arbeit verwendeten Systeme wurden nach einer modifizierten Synthesevorschrift von Guo *et al.* (1999, 2000) dargestellt (s. Kap. VII.1.4). Hierbei können *brush*-Systeme auf PS-Kerne enger Teilchengrößenverteilung aufpolymerisiert werden.



**Abb. III.1:** Schematische Darstellung des Syntheseweges: Die durch Emulsionspolymerisation dargestellten PS-Kerne mit enger Teilchengrößen werden zunächst mit Photoinitiator HMEM copolymerisiert. Anschließend wird wasserlösliches Monomer unter UV-Initiierung des Photoinitiators aufpolymerisiert.

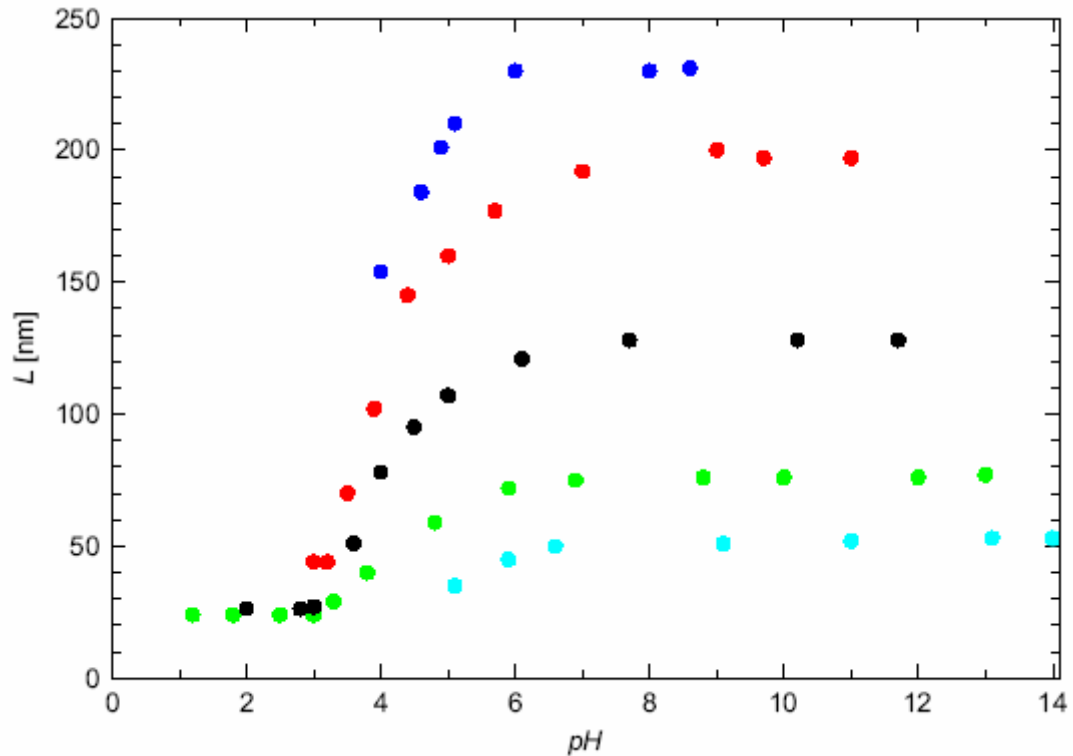
In Abbildung III.1 ist der durchgeführte Syntheseweg schematisch dargestellt. Dabei wird zunächst ein Polystyrolkern mit enger Teilchengrößenverteilung durch eine Emulsionspolymerisation synthetisiert. Auf diesen wird eine dünne Schicht des Photoinitiators Methacrylsäure-2-[4-(2-hydroxy-2-methyl-propionyl)-phenoxy]-ethylester (HMEM) aufpolymerisiert. Im folgenden Syntheseschritt werden Polyelektrolytketten durch UV-Strahlung aus wasserlöslichem Monomer Acrylsäure (AA) oder Natriumstyrolsulfonat (NaSS) auf der Oberfläche der im ersten Schritt synthetisierten Teilchen erzeugt. Hierbei

werden sowohl Radikale auf der Kernoberfläche, als auch in Lösung durch den UV-induzierten Zerfall des Photoinitiators erzeugt (s. Abb. III.2). Es bilden sich im gleichen Verhältnis an die Kernoberfläche kovalent gebundene Polyelektrolytketten und freie Polyelektrolytketten in Lösung. Die freien Polymerketten werden durch Ultrafiltration entfernt.



**Abb. III.2:** UV-induzierter Zerfall des Photoinitiators HMEM: Es entsteht jeweils ein Radikal auf der Kernoberfläche und ein Radikal in Lösung.

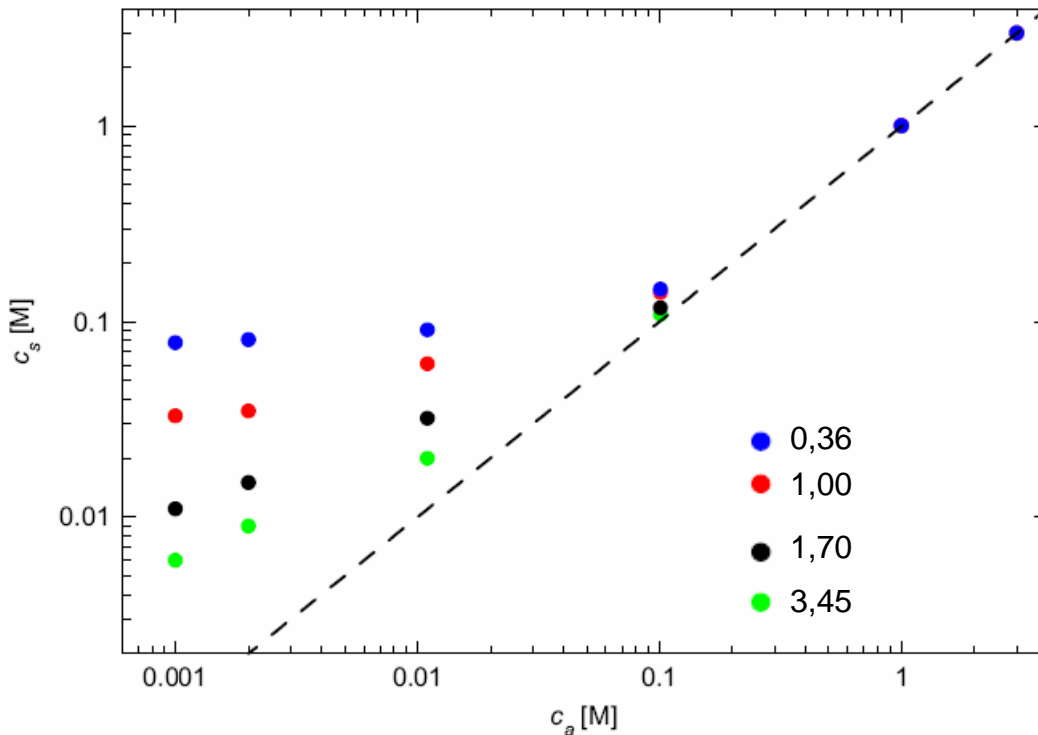
Durch die Synthese sind die Parameter Kernradius  $R$ , Konturlänge  $L_C$  und Oberflächendichte der Ketten  $\sigma$  einstellbar. Der Ausdruck *brush* bezeichnet eine Schicht von Polymerketten, die fest an eine Oberfläche geknüpft sind und deren benachbarte Ketten sich deutlich überlappen. Zusätzlich zur sterischen Abstoßung der Polymerketten liegt bei einem geladenen *brush* elektrostatische Abstoßung vor. Dies führt zu einer ausgezeichneten Stabilität der SPB gegen Aggregation. Die Schalendicke  $L$  ist durch Ionenstärke und Dissoziationsgrad der Polyelektrolytketten einstellbar. Werden schwache Elektrolyte wie z.B. Acrylsäure als Monomere verwendet, so wird von einem *annealed brush* gesprochen. Bei der Verwendung starker Elektrolyte wird ein *quenched brush* erhalten. Im Fall des *annealed brush* ist der Dissoziationsgrad und somit die Schalendicke vom  $pH$ -Wert abhängig. Diese kann z.B. mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in Abhängigkeit von  $pH$ -Wert und Ionenstärke gemessen werden (s. Abb. III.3) (Guo *et al.* 2000). Für einen *quenched brush* liegt vom  $pH$ -Wert unabhängig immer eine vollständige Dissoziation der Ketten vor, die Schalendicke ist also nur von der Ionenstärke abhängig.



**Abb. III.3:** Hydrodynamische Schalendicke  $L$  eines annealed brush in Abhängigkeit von pH-Wert und Fremdsalzkonzentration (Guo *et al.* 2000; blau: 0,0001 M; rot: 0,001 M; schwarz: 0,01 M; grün: 0,1 M; hellblau: 1 M).

Im Grenzfall des „osmotisches Limits“ des *brush* oder *osmotic brush* liegen keine Fremdsalzen vor, es herrscht innerhalb des *brush* somit durch die Gegenionen der Polyelektrolytketten ein hoher osmotischer Druck. Dies führt zu einer starken Streckung der Ketten, so dass diese bis fast an die Konturlänge der Ketten heranreichen kann (Guo *et al.* 2001). Laut der Theorien, die zur Beschreibung des *osmotic brush* aufgestellt wurden, befinden sich fast alle Gegenionen der Polymerketten innerhalb des *brush* (Pincus 1991). Molekulardynamiksimulationen für sternförmig verzweigte Polyelektrolyten von Jusufi *et al.* (2002) zeigten, dass die meisten Gegenionen entweder frei im Sterninneren oder entlang der gestreckten Polyelektrolytketten kondensiert vorliegen. Untersuchungen des osmotischen Koeffizienten  $\Phi$  von fremdsalzfreien *quenched brush*-Systemen wurden von Das *et al.* (2002) durchgeführt. Der osmotische Koeffizient ist das Verhältnis des experimentell ermittelten zum nach van't Hoff berechneten idealen osmotischen Druck und stellt ein Maß für die osmotische Aktivität der Gegenionen der Polyelektrolytketten dar. Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass nur 2 - 6 % der Gegenionen zum osmotischen Druck beitragen. Die restlichen Gegenionen sind innerhalb der *brush*-Schicht lokalisiert und können diese nicht verlassen. Dabei ist der osmotische Koeffizient unabhängig von der Teilchenkonzentration und nimmt mit zunehmender Konturlänge  $L_c$  der Polyelektrolytketten ab. Mittels anormaler

Röntgenkleinwinkelstreuung (ASAXS, Dingenouts *et al.* 2003) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die meisten Gegenionen den *brush* nicht verlassen können.

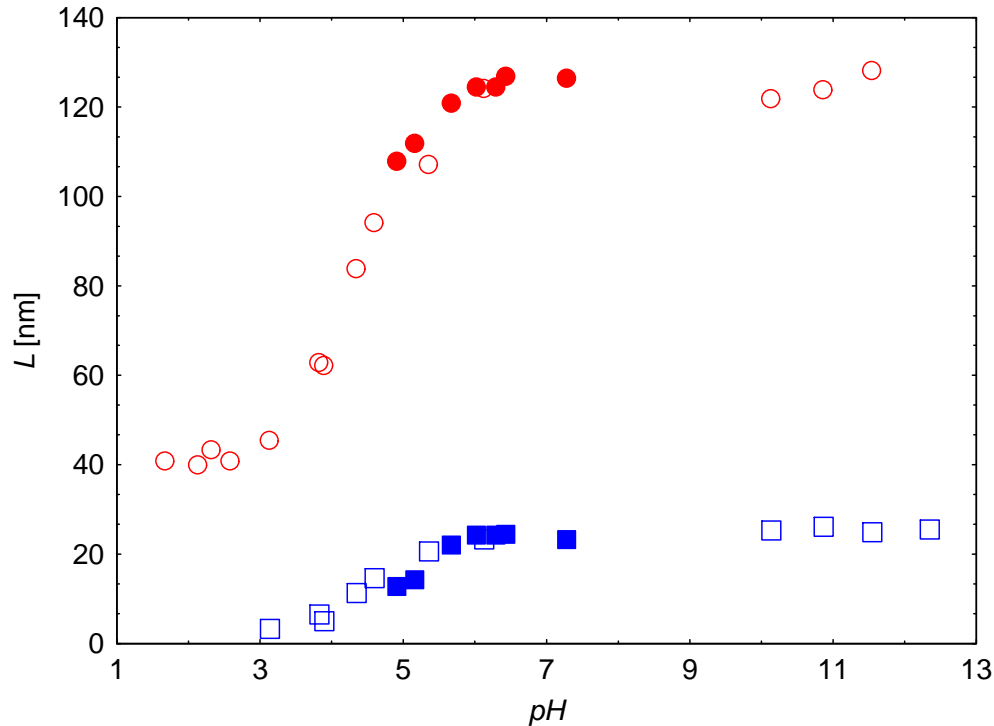


**Abb. III.4:** Ionenstärke  $c_s$  innerhalb des *brush* als Funktion der äußeren Ionenstärke  $c_a$ . Die unterschiedlichen Messreihen repräsentieren Systeme mit unterschiedlichem  $R/L_c$  Verhältnis. (Guo *et al.* 2000)

In dieser Arbeit wurden *brush*-Systeme in Puffersysteme eingesetzt, d.h. die Abhängigkeit der Ionenstärke im *brush* von der äußeren Fremdsalzkonzentration muss betrachtet werden. Die Ionenstärke  $c_s$  innerhalb des *brush* kann nach einer Theorie von Hariharan *et al.* (1998) als Funktion der äußeren Ionenstärke  $c_a$  berechnet werden (Guo *et al.* 2000). Wie in Abb. III.4 dargestellt, ist die Ionenstärke im Bereich des *osmotic brush*, also bei niedriger äußerer Fremdsalzkonzentration nahezu konstant. Die Höhe des Plateauwertes in  $c_s$  entspricht der Gegenionenkonzentration im *brush*. Dieser Wert steigt mit zunehmender Dichte der Polyelektrolytketten pro Volumen bzw. sinkendem  $L_c/R$ -Verhältnis. Bei langkettigen Polyelektrolytketten bzw. hohem  $L_c/R$ -Verhältnis tritt durch die sphärische Geometrie des Systems kein ausgeprägtes Plateau der Ionenstärke auf. Mit steigender äußerer Fremdsalzkonzentration wird der Bereich des *salted brush* erreicht. Hier entspricht  $c_s$  in etwa  $c_a$ . Der Übergang erfolgt bei einer Ionenstärke von etwa 0,1 M.

Die Adsorption von Proteinen wurde wie oben angesprochen in Puffersystemen durchgeführt. Für *annealed brushes* wurde die *pH*-Abhängigkeit der hydrodynamischen Schalendicke  $L$  bei konstanter Ionenstärke mittels DLS gemessen, um einen eventuellen Einfluss des Puffers

festzustellen. Wie in Abb. III.5 zu erkennen ist, hat die Schale für  $pH$ -Werte oberhalb von 6 ihre maximale Streckung erreicht. Für die in dieser Arbeit eingesetzten Puffersysteme liegen die Partikel mit maximaler Streckung der Polyelektrolytketten vor.



**Abb. III.5:**  $pH$ -Abhängigkeit der Schalendicke zweier annealed brush-Systeme mit unterschiedlicher Konturlänge  $L_c$  in NaCl-Lösung (offene Symbole) und MES-Puffer (geschlossene Symbole) bei konstanter Ionenstärke (0,08 M). Die Messung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (Wittemann et al. 2003).

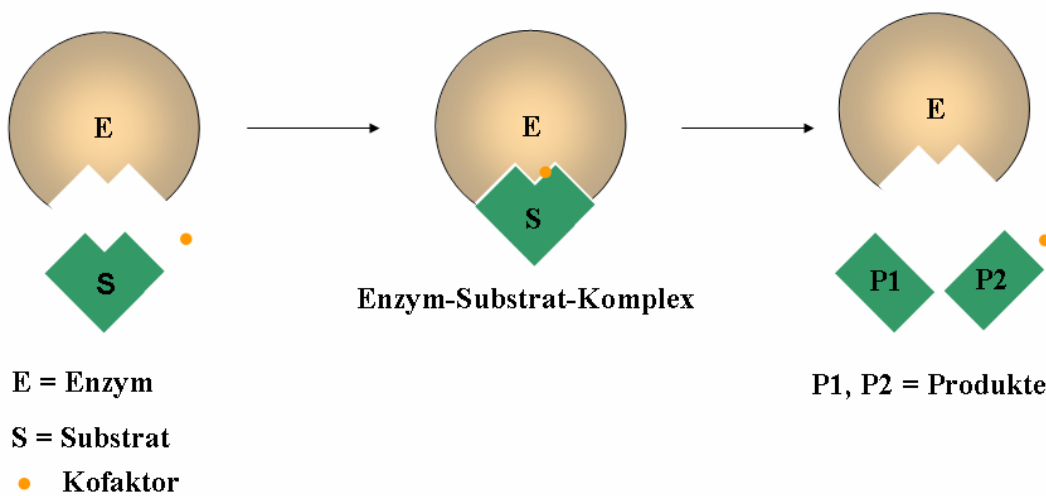
In dieser Arbeit wurden zwei SPB-Systeme untersucht. Als *annealed brush*-System wurde KPS21 verwendet, als *quenched brush*-System KPSS2. Die wichtigsten Parameter dieser Systeme sind in Tab. III.1 aufgeführt.

**Tab.III.1:** Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Latices.

Latex	KpS21	KpSS2
Kernradius $R$ [nm]	56	56
Schalendicke $L$ in $H_2O$ [nm]	25	93

### III.2. Enzyme

Enzyme sind katalytisch wirkende Proteine, d.h. sie werden während der Umsetzung des Substrats in Produkt nicht verbraucht. Für viele Reaktionen werden Kofaktoren so genannte Koenzyme benötigt, z.B.  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH). Die hohe Substratspezifität der Enzyme wurde zuerst von E. Fischer durch das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ erklärt, d.h. das Substrat passt genau in die dafür vorgesehene Enzymtasche (Abb. III.6) (Copeland 2000). Haldane und Pauling verfeinerten dieses Modell durch ihre Hypothese, dass die Bindungsstellen der Enzyme komplementär zum Übergangszustand der Reaktion sind (Copeland 2000, Bisswanger 2000).



**Abb. III.6:** Schematische Darstellung des „Schlüssel-Schloss-Prinzips: Das Substrat passt genau in die Enzymtasche.

Enzyme werden in 6 Klassen eingeteilt: Oxidoreductasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen, (Buchholz *et al.* 1997). Die Spezifität lässt sich durch den Aufbau der Enzyme erklären. Wie alle Proteine setzen sich Enzyme aus bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren zusammen. Ihre Sequenz wird Primärstruktur genannt. Als Sekundärstruktur werden  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt bezeichnet. Durch Wechselwirkungen innerhalb der Enzyme ergibt sich die Tertiärstruktur, sie ist für die äußere Form des Enzyms von großer Bedeutung. Die Quartärstruktur wird durch Ausbildung von Oligomeren verursacht, d.h. die Anordnung von mindestens zwei Proteinen zueinander im Raum wird so bezeichnet (Dautz *et al.* 1995). Diese Strukturen sind gerade bei Enzymen für ihre Funktion von großer Bedeutung, da bei Strukturänderungen Aktivitätsverlust bis hin zur völligen Deaktivierung auftreten kann (Lottspeich *et al.* 1998).

Für den Einsatz bei z.B. industriellen Anwendungen werden Enzyme oft immobilisiert, um diese effizient einzusetzen. Dies kann durch verschiedene Vorgehensweisen realisiert werden. Der Einschluss in eine Matrix kann hierbei in Membranen (Saito *et al.* 2002) oder Gelen (Bahar *et al.* 2000) erfolgen. Auch die Einbettung in Polyelektrolytmultischichten (Decher *et al.* 1992) gehört zu dieser Methode. Enzyme werden zurückgehalten, niedermolekularen Substrate und Produkte können jedoch in das Reaktionsmedium gelangen. Vorteil dieser Methode ist, dass Enzyme nicht durch Kupplungsreagenzien in ihrer Konformation verändert werden und die Enzyme in homogener Phase vorliegen. Als Nachteil erweist sich eine mögliche Diffusionshemmung der Enzymreaktion und die fehlende Möglichkeit zur Entladung der Trägerpartikel. Eine weitere Methode zur Einhüllung von Enzymen ist der Einschluss in Hohlkugeln (Donath *et al.* 1998). Hier ist ebenfalls die Diffusion von Substrat und entstehenden Produkten entscheidend für die enzymatische Aktivität.

Für die Immobilisation hoher Mengen an Enzym ist eine große Oberfläche der Partikel notwendig. Dies kann durch kolloidale Partikel erreicht werden (Kawaguchi 2000). Insbesondere für die Anbindung von Enzymen werden diese genutzt. Die Anbindung kann kovalent erfolgen, also durch Einsatz von Kupplungschemikalien wird Enzym angebunden. Dadurch kann die Aktivität vermindert werden, da die Funktion des Enzyms durch die Anbindung gestört werden kann. Dies kann durch Konformationsänderung durch die Anbindung oder auch durch Blockade des aktiven Zentrums geschehen. Die kovalente Bindung wird allerdings nicht von *pH*-Wert oder Ionenstärkeänderungen beeinflusst, d.h. die Reaktionsbedingungen können bezüglich dieser Parameter variiert werden, ohne Enzym abzulösen. Zudem kann gebundenes, aktives Enzym durch kovalente Bindungen in seiner Konformation stabilisiert werden. Dadurch wird eine gegenüber dem freien Enzym erhöhte Langzeitstabilität erreicht.

Hingegen werden für die adsorptive Bindung keine Kupplungsreagenzien benötigt. Die Enzyme werden auf Trägermaterialien adsorbiert, als Triebkräfte werden hier oft hydrophile Wechselwirkungen diskutiert. Des Weiteren kann die Immobilisation durch elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen, dies wird mit Ionentauscherharzen durchgeführt. Vorteilhaft ist, dass diese Immobilisationstechnik einfach durchzuführen ist. Die Enzyme können durch Änderung des *pH*-Wertes und Ionenstärke leicht entfernt werden. Die Proteinkonformation wird durch die Adsorption durch Spreitung verändert (Czeslik *et al.* 2001). Dies kann zur Verringerung der Enzymaktivität führen.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme beschrieben werden.

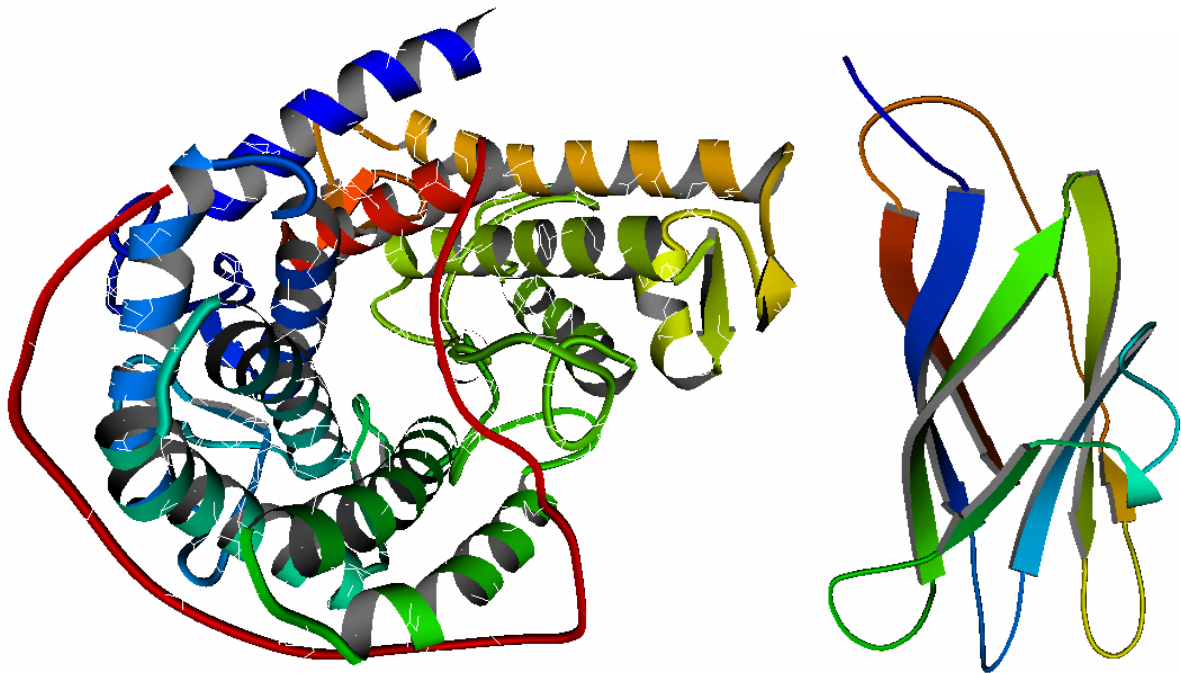
### III.2.1 Glucoamylase

Glucoamylase (Amyloglucosidase, 1,4-D-Glucan-Glucohydrolase,  $\gamma$ -Amylase, exo-1,4- $\alpha$ -glucosidase; EC 3.2.1.3) gehört zur Enzymklasse der Amylasen. Durch sie werden  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen vom nichtreduzierenden Ende her gespalten, d.h. es wird z.B. Stärke zu  $\beta$ -D-Glucose abgebaut.  $\alpha,\beta$ -(1,1)-,  $\alpha$ -(1,2)-,  $\alpha$ -(1,3)- und  $\alpha$ -1,6-glycosische Bindungen können ebenfalls gespalten werden, allerdings mit einer wesentlich geringeren Geschwindigkeit (Coutinho *et al.* 1997, Christensen 2000).

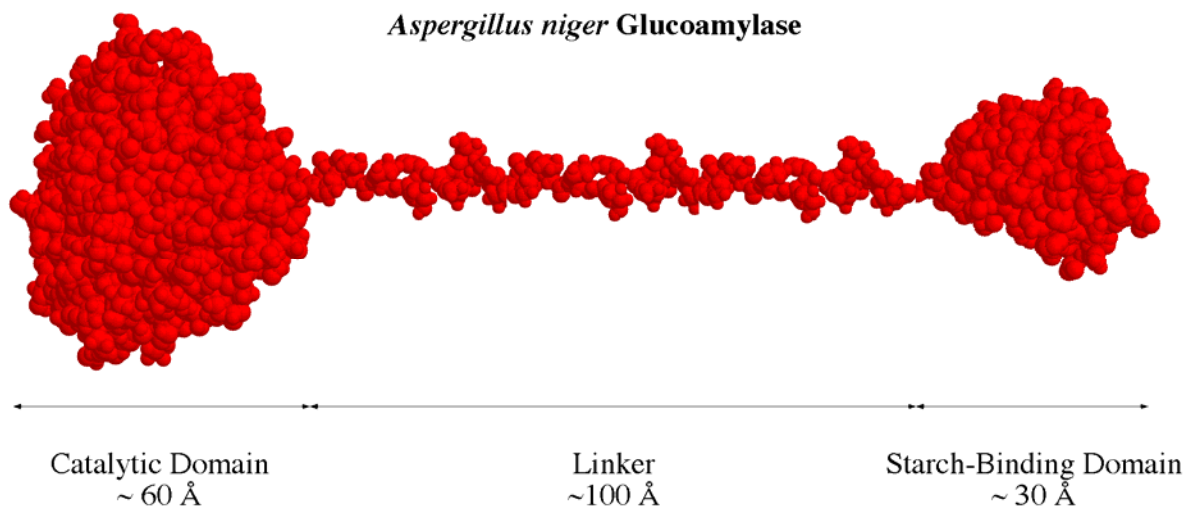
In der Natur kommt Glucoamylase (GA) als GA1 und GA2 vor. GA1 besteht aus einem stärkebindenden und katalytischen Zentrum, die über ein Verbindungsstück aus Protein verknüpft sind. An diesem Verbindungsstück sind glycosidische Reste angebracht (Coutinho *et al.* 1997, Christensen *et al.* 1999), die eine genaue Berechnung der Molmasse aus der Aminosäuresequenz unmöglich macht. Variante GA2 unterscheidet sich von GA1 durch das Fehlen eines stärkebindenden Zentrums. Die hier verwendete GA wurde aus *Aspergillus niger* gewonnen, diese ist beinahe identisch mit der GA, die aus *Aspergillus awamori* var. X100 (Christensen *et al.* 1999, 2000) gewonnen wird. Nur für das stärkebindende (PDB 3GLY, Abb. III.7) und enzymatisch aktive Zentrum (PDB 1AC0, Abb. III.6) ist die genaue Struktur bekannt (Sorimachi *et al.* 1997, Sauer *et al.* 2000). Die komplette Struktur wurde noch nicht aufgeklärt. Eine schematische Darstellung der GA1 ist in Abb. III.8 (<http://www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>) dargestellt.

Die Glucoamylase wird bei der Herstellung von Fructose Sirup, Glucose und Maltose aus Stärke, in der Brauindustrie und in der Ethanolproduktion verwendet (Kumar *et al.* 2003). Dieses Enzym katalysiert den Abbau von Stärke in Maltose und Glucose. Das Optimum in der Aktivität liegt bei *pH* 4,0 bis 5,0 und einer Temperatur von 40- 60 °C und ist im Bereich von *pH* 3,0-7,0 sowie bis zu einer Temperatur von 60 °C stabil (Saha *et al.* 1989). Der isoelektrische Punkt der Glucoamylase ist in der Literatur mit 3,5 angegeben (Wenisch *et al.* 1993).





**Abb. III.7:** Struktur des katalytisch aktiven Zentrums (links, PDB 3GLY) und des stärkebindenden Zentrums (rechts, PDB 1AC0) der GA *Aspergillus awamori* var. X100

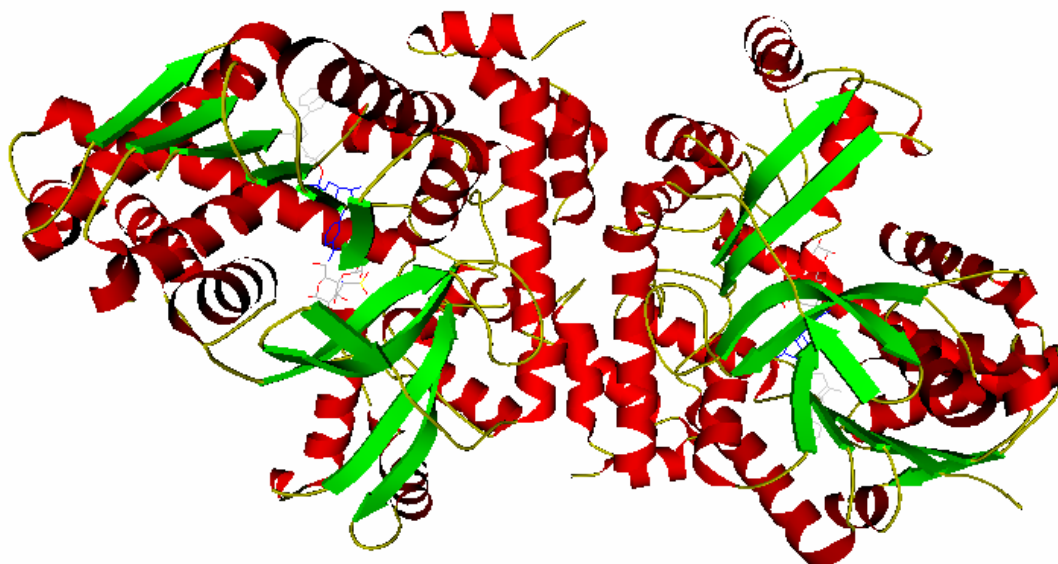


**Abb. III.8:** Schematischer Aufbau der Glucoamylase *Aspergillus niger* (<http://www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>). Das katalytische Zentrum und das stärkebindende Zentrum sind durch Kernspinresonanz- und röntgenographischen Untersuchungen charakterisiert worden (Sorimachi et al. 1997, Sauer et al. 2000).

### III.2.2 $\alpha$ -D-Glucosidase

$\alpha$ -D-Glucosidase (Maltase,  $\alpha$ -D-Glucosidhydrolase; EC 3.2.1.20) gehört zur Klasse der Glucosidasen bzw. Hydrolasen. Dieses Enzym spaltet 1,4- und 1,6- $\alpha$ -glycosidische Bindungen und setzt  $\alpha$ -D-Glucose frei. Das Enzym ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet, es dient unter anderem der Freisetzung von Glucose als Energielieferant.

Die hier verwendete  $\alpha$ -D-Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* gehört zur Familie I der  $\alpha$ -D-Glucosidasen (Krasikov *et al.* 2001, Chiba 1997). Das Molekulargewicht beträgt laut Literatur 68500 Dalton (Kelly *et al.* 1983). In Abb. III.9 ist die dimere Struktur für  $\alpha$ -D-Glucosidase von *Thermotoga maritima* (PDB 1OBB) gezeigt. Diese gehört zu Familie 4 der Glucosidasen (Lodge *et al.* 2003).

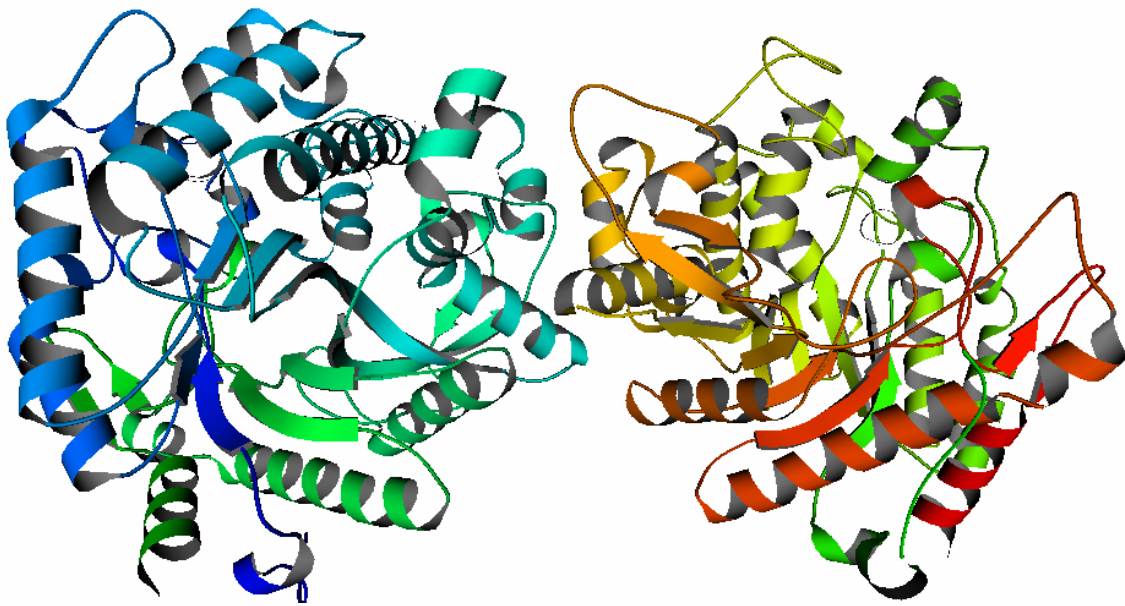


**Abb. III.9:** Dimere Struktur der  $\alpha$ -D-Glucosidase aus *Thermotoga Maritima* (PDB 1OBB).

### III.2.3 $\beta$ -D-Glucosidase

$\beta$ -D-Glucosidase ( $\beta$ -D-Glucosid Glucohydrolase; EC 3.2.1.21) gehört wie  $\alpha$ -D-Glucosidase zur Klasse der Glucosidasen und katalysiert die Spaltung von 1,4- und 1,6- $\beta$ -glycosidische Bindungen zu  $\beta$ -D-Glucose. Das Enzym ist in der Natur weit verbreitet, so dient es z.B. zusammen mit Oxynitrilase zur Freisetzung von HCN als Pflanzenabwehrmechanismus (Mattheus de Roode *et al.* 2003). Der isoelektrische Punkt liegt bei 7,3 (Grover *et al.* 1977).

In der Technik wird  $\beta$ -D-Glucosidase vor allem als eines von 3 Enzymen für den Abbau von Cellulose in Zucker, der für die Herstellung von Alkohol, der als Treibstoff dient, verwendet wird, benutzt (Saha 1996). Die genaue Struktur für die in dieser Arbeit verwendete  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln ist noch nicht aufgeklärt. Sie gehört zur Familie I der  $\beta$ -D-Glucosidasen (He *et al.* 1997) wie z.B.  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mais (Zmglu1, PDB 1E1E, Abb. III.10). Czjzek *et al.* (2001) zeigten, dass die von ihnen untersuchten Enzyme der Familie I alle eine ähnliche Tertiärstruktur besitzen. Sie liegen als Dimere vor, deren Monomere eine globuläre Form aufweisen. Untersuchungen von Grover *et al.* (1977) zeigten, dass  $\beta$ -D-Glucosidase aus zwei identischen Untereinheiten von jeweils 65 kD aufgebaut ist. Daraus kann gefolgert werden, dass die hier verwendete  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln der Tertiärstruktur der untersuchten Familie I  $\beta$ -D-Glucosidasen folgt und die Untereinheit eine globuläre Struktur besitzt.

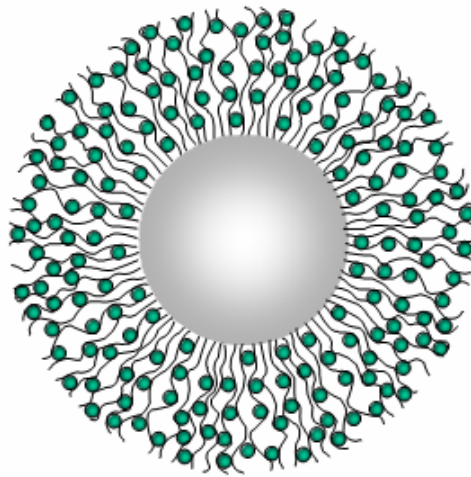


**Abb. III.10:** Dimere Struktur der  $\beta$ -D-Glucosidase Zmglu1 aus Mais (PDB 1E1E), die wie  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln zur Familie I gehört (Czjzek *et al.* 2001).

## IV. Enzymadsorption

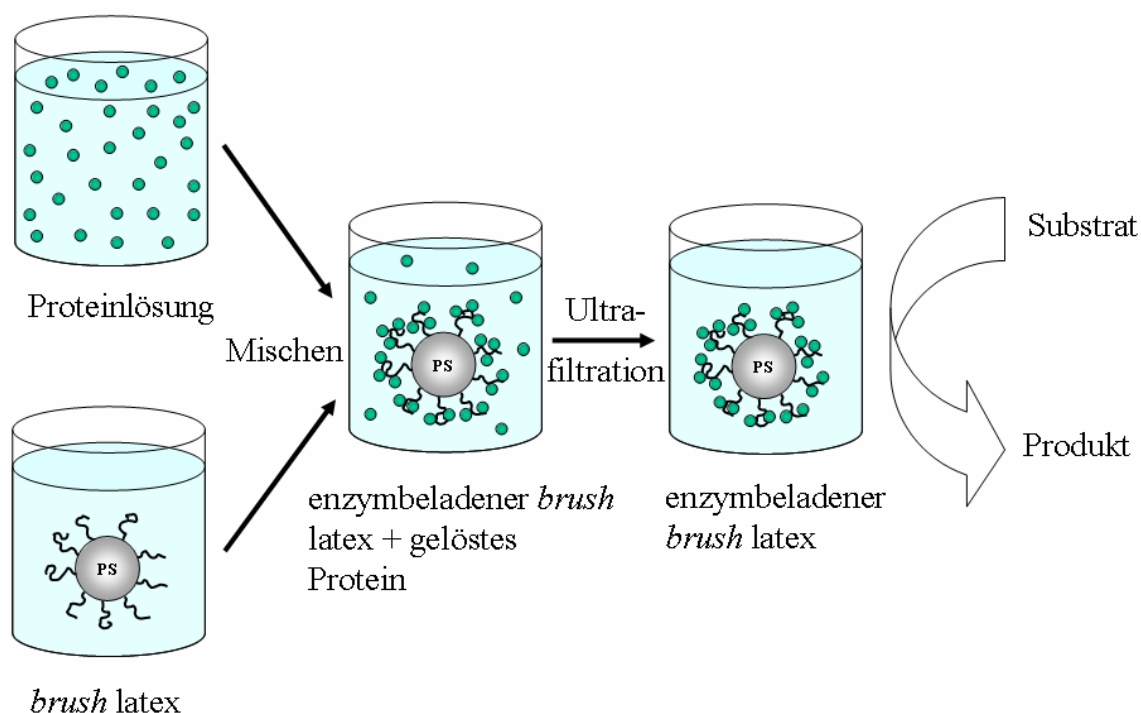
### IV.1 Adsorptionsexperimente

Untersuchungen von Wittemann *et al.* (2003, 2004) zeigten, dass große Mengen von Proteinen auf SPB adsorptiv immobilisiert werden können. Untersuchungen mittels SAXS konnten zeigen, dass RNase A innerhalb des *brush* immobilisiert war (s. Abb. IV.1, Rosenfeldt *et al.* 2004).



**Abb. IV.1:** Aus der mittels SAXS aufgenommenen Streukurve von auf SPB immobilisierte RNase A lässt sich zeigen, dass das Protein sich innerhalb des brush befindet (Rosenfeldt *et al.* 2004).

Diese Immobilisationsmethode wurde für die Immobilisation von Enzymen verwendet, um deren Verhalten nach erfolgter Adsorption bezüglich ihrer Aktivität zu untersuchen. Die schematische Vorgehensweise für diese Experimente ist in Abb. IV.2 dargestellt. Es werden gelöstes Enzym und mit Pufferlösung verdünnter Latex miteinander vermischt. Das nicht oder nur sehr leicht adsorbierte Enzym wird wieder entfernt und die Beladung der Partikel ermittelt. Danach erfolgt die Bestimmung der enzymatischen Aktivität.



**Abb. IV.2:** Schematische Darstellung des Adsorptionsexperimentes. Im ersten Schritt werden Enzymlösung und Latex miteinander vermischt. Nach der Entfernung von nicht oder nur sehr schwach gebundenem Enzym wird die Beladung der Partikel bestimmt. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Aktivität.

Für die Wahl eines geeigneten Enzyms mussten folgende Punkte beachtet werden: Der *pH*-Wert des Systems muss oberhalb des pI-Wertes des Enzyms liegen, damit es zu keiner Aggregation des Enzyms mit den Latexpartikeln kommt. Je näher der gewählte *pH*-Wert am pI-Wert liegt, desto mehr Adsorption ist zu erwarten. Da als Puffersysteme nur zwitterionische Systeme geeignet waren und deren Auswahl beschränkt war, konnte der *pH*-Wert nicht über den gesamten Bereich variiert werden.

Für die hier durchgeführten Adsorptionsexperimente wurden folgende Puffersysteme verwendet: N-Morpholino-ethansulfonsäure (MES, *pH* 6,1), 3-N-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS, *pH* 7,1), 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure (CHES, *pH* 9,3). Des Weiteren mussten die Enzyme in großen Mengen verfügbar sein und unter den Bedingungen der Adsorption aktiv sein. Die Aktivität musste mit UV/VIS-Spektroskopie nachweisbar sein, da dies die Standardmethodik für den Nachweis sein sollte. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben wurden drei Enzyme ausgewählt.

In Tabelle IV.1 sind die isoelektrischen Punkte der verwendeten Enzyme aufgeführt. Alle gewählten Enzyme gehören den Hydrolasen an und spalten glycosidische Bindungen. Dies diente zur Vereinheitlichung der Enzymtests. Durch die Verwendung von flexiblen und

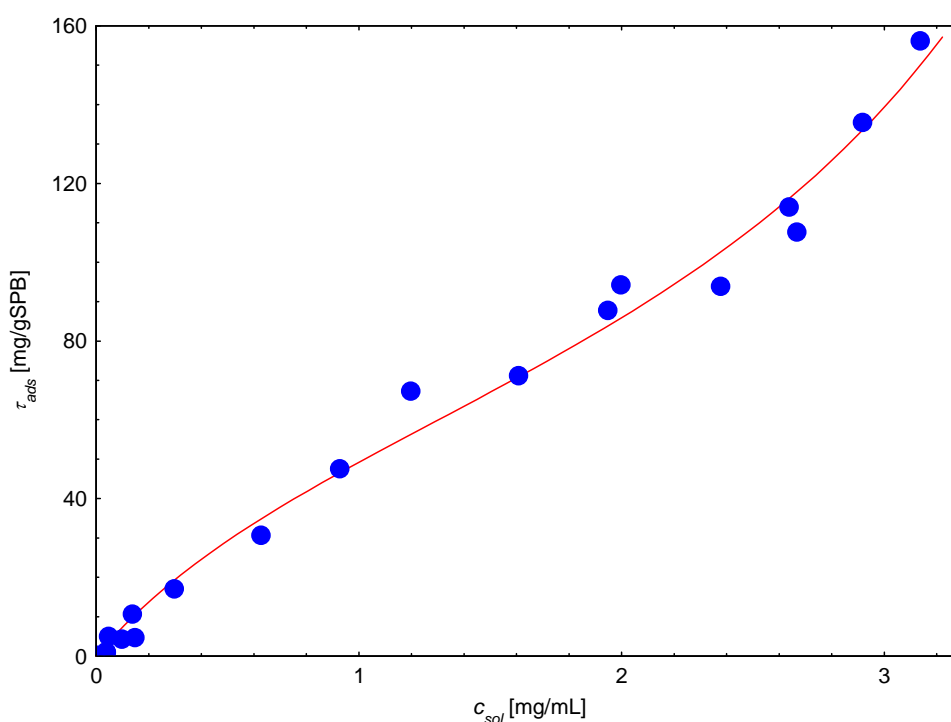
globulären Enzymen sollte geklärt werden, ob ein Trend für das Adsorptionsverhalten der Enzyme aus den Ergebnissen abzulesen ist. Die Durchführung der Adsorptionsexperimente ist in Kap. VI.2.5 beschrieben.

**Tab.IV.1:** Isoelektrische Punkte der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

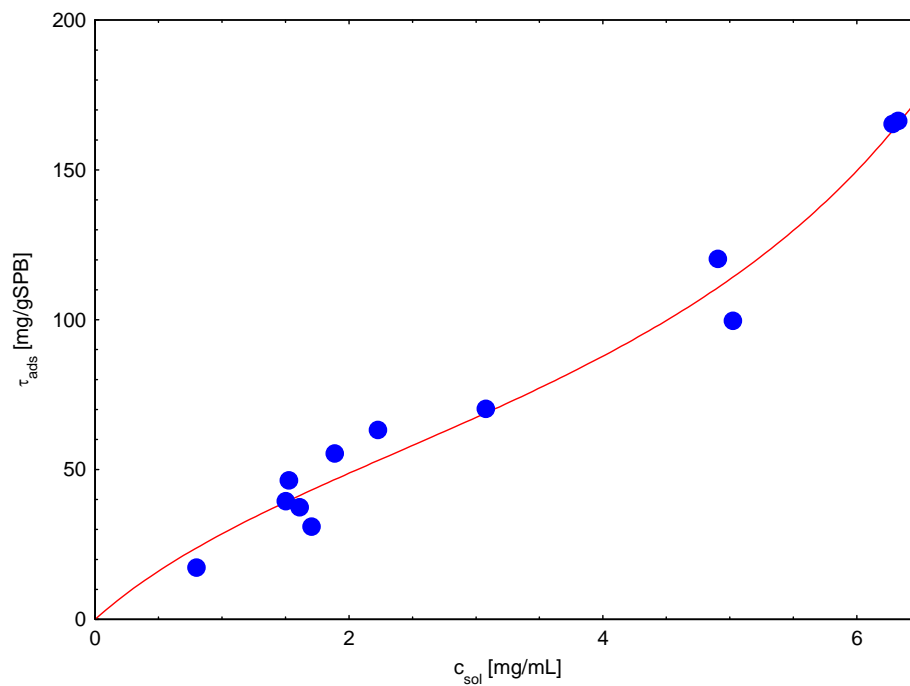
Enzym	Glucoamylase	$\alpha$ -D-Glucosidase	$\beta$ -D-Glucosidase
pI	3,5	4,5	7,3

### IV.1.1 Adsorption von Glucoamylase

Der pI-Wert der Glucoamylase liegt bei einem  $pH$ -Wert von 3,5, daher wurde für dieses Enzym als Puffersystem 10 mM MES gewählt. Die Adsorption erfolgte auf KpS21, einem *annealed brush* (Abb. IV.3), und KpSS2 (Abb. IV.4), einem *quenched brush*.



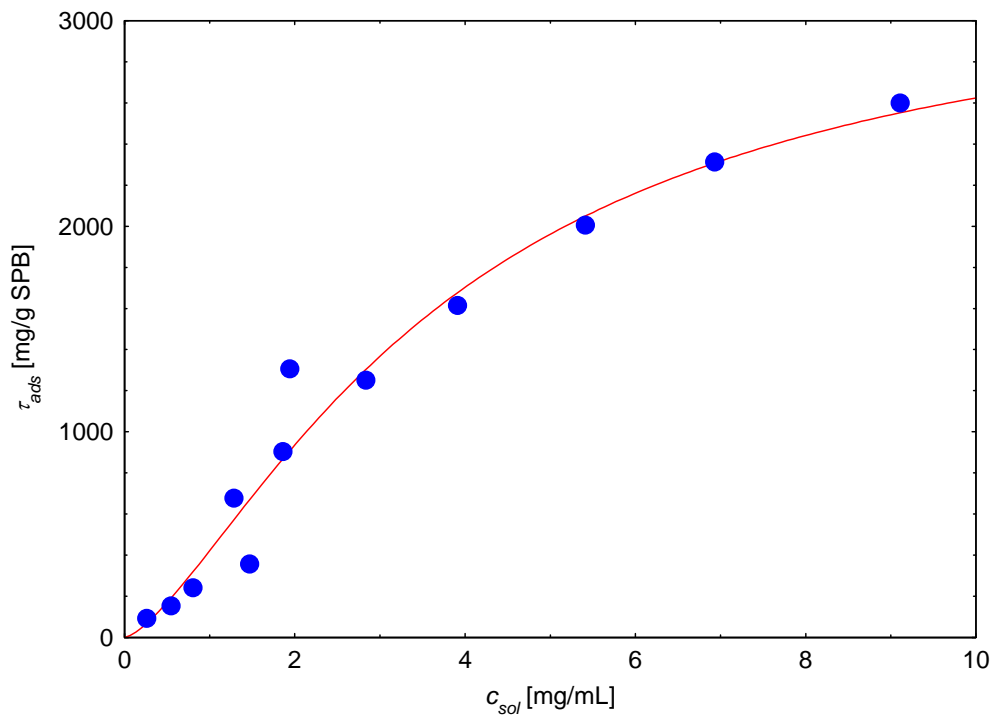
**Abb. IV.3:** Adsorptionskurve für die Adsorption von Glucoamylase aus *Aspergillus niger* auf KpS21 (*annealed brush*) bei einem  $pH$ -Wert von 6,1 in 10 mM MES-Puffer. Die rote Linie entspricht einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung IV-8.



**Abb.IV.4:** Adsorptionskurve für die Adsorption von Glucoamylase aus *Aspergillus niger* auf KpSS2 (quenched brush) bei einem pH-Wert von 6,1 in 10 mM MES-Puffer. Die rote Linie entspricht einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung IV-8.

## IV.1.2 Adsorption von $\alpha$ -D-Glucosidase

Die Adsorption dieses Enzyms erfolgte auf KpS21 (*annealed brush*) in 10 mM MES-Puffer (*pH* 6,1) (Abb. IV.5). Von den untersuchten Enzymen wurde  $\alpha$ -D-Glucosidase am stärksten adsorbiert. Es konnte eine Beladung der Trägerpartikel von über 2,4 g Enzym pro g Trägerpartikel erreicht werden.

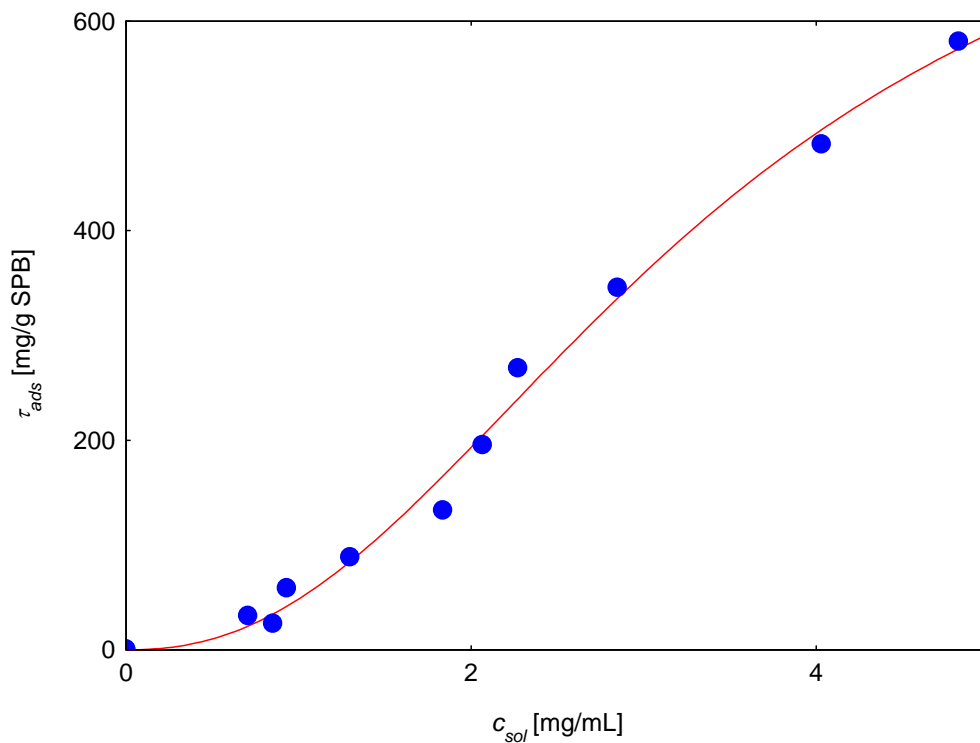


**Abb.IV.5:** Adsorptionskurve für die Adsorption von  $\alpha$ -D-Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* auf KpS21 (annealed brush) bei einem pH-Wert von 6,1 in 10mM MES-Puffer. Die rote Linie entspricht einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung IV-10.

### IV.1.3 Adsorption von $\beta$ -D-Glucosidase

Da der isoelektrische Punkt von  $\beta$ -D-Glucosidase bei 7,3 liegt, wurde für die Adsorption auf KpS21 (annealed brush) 10 mM MOPS-Puffer (pH 7,1) verwendet. Dies wurde so gewählt, damit eine Untersuchung direkt in der Nähe des isoelektrischen Punktes durchgeführt werden konnte. CHES-Puffers (pH 9,3) wurde nicht verwendet, um eine hohe Immobilisationsmenge zu erreichen. Hier wurden gezielt jeweils drei Wiederholungsexperimente bei niedrigen, mittleren und hohen Adsorptionswerten durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Werte zu überprüfen. Über 500 mg/g TP konnten keine Werte mehr aufgenommen werden, da hier der Latex koagulierte. Die Lagerstabilität war für Beladungen mit mehr als 300 mg/g TP herabgesetzt. Es trat eine Koagulation des Latex nach zwei bis drei Monaten auf. Die Koagulation ist damit zu erklären, dass durch die Nähe zum isoelektrischen Punkt die Stabilität der Partikel durch Ladungsausgleich herabgesetzt wurde. Dies beeinflusste die Aktivitätsuntersuchungen jedoch nicht, da die Enzymtests kurz nach der Reinigung durchgeführt wurden. Die entsprechende Kurve ist in Abb. IV.6 dargestellt.





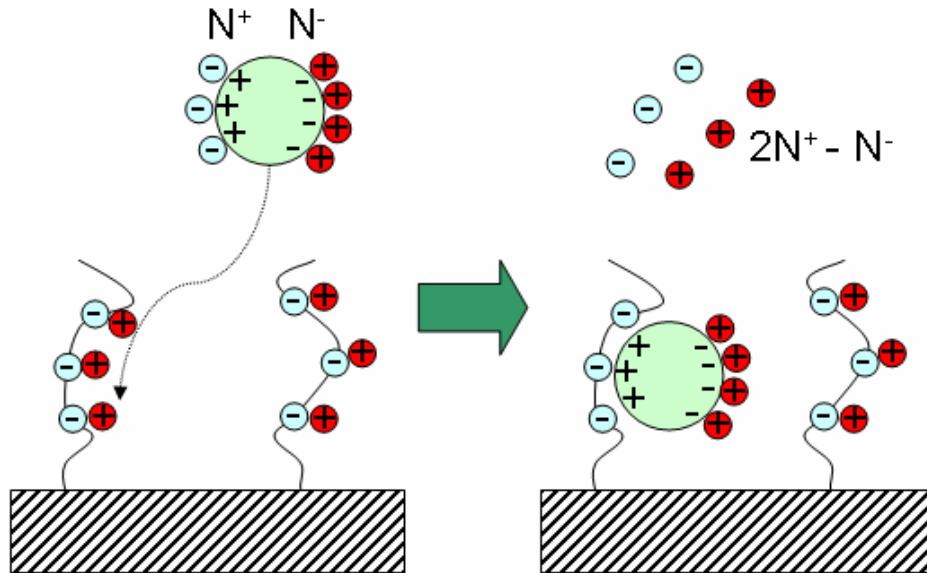
**Abb.IV.6:** Adsorptionskurve für die Adsorption von  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln auf KpS21 (annealed brush) bei einem pH-Wert von 7,1 in 10mM MOPS-Puffer. Die rote Linie entspricht einer Fit-Anpassung der Werte nach Gleichung IV-10.

## IV.2 Triebkräfte der Adsorption

Nun sollen die Triebkräfte für die Adsorption auf Substraten betrachtet werden. Dies können van der Waals, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sein. Zusätzlich kann bei der Adsorption auf Substraten ein entropischer Gewinn durch Konformationsänderungen auftreten (Czeslik 2004). Dies ist in der Literatur für kolloidale Partikel (Wertz *et al.* 2001, 2002, Jackler *et al.* 2002,) beschrieben. So beobachteten Czeslik *et al.* (2001) die Spreitung von Lysozym auf Silicapartikeln. Die Konformationsänderungen wurden mittels Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie untersucht.

Diese Triebkräfte müssen der Abstoßung entgegenwirken, die vor allem durch elektrostatische und sterische Wechselwirkungen verursacht wird. Betrachtet man die in dieser Arbeit verwendeten Systeme, so sollte eine Adsorption auf den ersten Blick nicht auftreten, da neutrale *brush*-beschichtete Trägerpartikel in der Medizin zur Verminderung von Proteinadsorption (Ostuni *et al.* 2001) dienen. Dies wurde durch sterische Repulsion zwischen Protein und *brush*-Schicht von Jeon *et al.* (1991) erklärt. Da bei allen in dieser Arbeit

verwendeten Enzym/SPB Kombinationen der  $pH$ -Wert der Systeme über dem isoelektrischen Punkt der entsprechenden Enzyme liegt, d.h. die Enzyme sind wie die SPB negativ geladen, tritt zusätzlich eine elektrostatische Abstoßung auf.



**Abb.IV.7:** Schematische Darstellung der Proteinadsorption auf SPB. Ein Protein mit  $N^+$  positiven und  $N^-$  negativen Ladungen setzt bei der Adsorption  $2N^+ - N^-$  Gegenionen frei.

Um die Adsorption von negativ geladenen Proteinen auf negativ geladenen SPB zu erklären, stellten Wittemann *et al.* (2003) folgende Hypothese auf: Es ist bekannt, dass die Proteinoberfläche durch ihren Aufbau aus unterschiedlich geladenen Aminosäuren neutrale, negativ und positiv geladene Bereiche, so genannte *patches*, aufweist (Carter *et al.* 1994). Positiv geladene *patches* können mit den negativ geladenen Ketten eines Makroion wechselwirken. Dadurch werden Gegenionen des Proteins und des *brush* freigesetzt. Die freigesetzten Gegenionen führen zu einem Entropiegewinn des Systems und sind treibende Kraft der Adsorption. Zusätzlich wird der innerhalb des *brush* herrschende osmotische Druck abgebaut. Als theoretisches Modell für diese Hypothese wurde das für DNA-Adsorption an negativ geladenen Oberflächen von Fleck und von Grünberg aufgestellte Konzept der *counterion release force* verwendet (Fleck *et al.* 2001, Meier-Koll *et al.* 2004). In Abb. IV.7 ist dies schematisch dargestellt. Das zu adsorbierende Protein besitzt  $N^+$  positive und  $N^-$  negative Ladungen. Durch die Adsorption werden nun  $2N^+$  Gegenionen frei gesetzt, aber auch  $N^-$  Gegenionen in den *brush* aufgenommen. Somit werden  $2N^+ - N^-$  Gegenionen frei gesetzt. Dies ist Triebkraft der Adsorption.

Anhand der Untersuchungen der Adsorption von Rinderserum Albumin (BSA) auf SPB konnten Wittemann *et al.* (2004) zeigen, dass die Adsorption von  $pH$  und Ionenstärke

beeinflusst wird. Liegt bei niedriger Ionenstärke ein *osmotic brush* vor, so erfolgt eine starke Adsorption von BSA. Wird die Ionenstärke erhöht, so dass ein *salted brush* vorliegt, nimmt die adsorbierte Menge drastisch ab und nähert sich dem Grenzfall eines carboxylierten Systems an. Dies spricht für die Freisetzung von Gegenionen als Triebkraft, da nur im Falle eines *osmotic brush* die Gegenionen innerhalb des *brush* gefangen sind, für den Fall eines *salted brush* resultiert keine Entropieerhöhung. Van der Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen können deshalb keine bedeutenden Triebkräfte für die Adsorption von Proteinen sein, da sonst der erhebliche Rückgang der adsorbierten Menge bei steigender Ionenstärke nicht zu erklären ist. (Czeslik 2004)

Konformationsänderungen als Triebkraft der Reaktion konnte Wittemann (2004) für *annealed brushes* ausschließen. Konformationsuntersuchungen mittels CD- und FT-IR-Spektroskopie zeigten, dass während der Adsorption oder nach Desorption von BSA keine Konformationsänderungen auftraten. Dies wurde damit erklärt, dass im Gegensatz zur Adsorption auf einer Oberfläche, bei der die Maximierung der Wechselwirkungsfläche auftritt, die Proteine in die *brush*-Schale eingebettet sind. Dies konnte mittels SAXS-Messungen gezeigt werden (Rosenfeldt *et al.* 2004). Variation des *pH*-Wertes zeigte, dass die Adsorption zunimmt, je näher der *pH*-Wert dem isoelektrischen Punkt des Proteins angenähert wurde. Allerdings wurden für den Fall, dass der eingestellte *pH*-Wert kleiner als der isoelektrischen Punkt des Proteins ist, also Protein und *brush* entgegengesetzt geladen sind, keine Ergebnisse erhalten, da eine Koagulation des Latex auftrat.

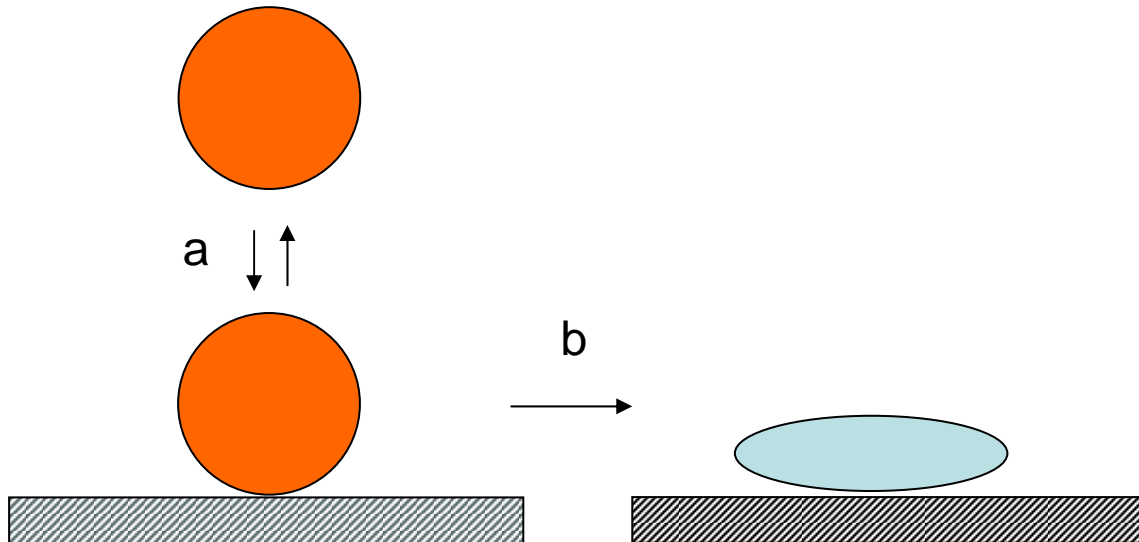
Die hervorragenden Eigenschaften der SPB zur einfachen Immobilisation von Proteinen sollte innerhalb dieser Arbeit für die Adsorption von Enzymen ausgenutzt werden. Die Adsorption von Proteinen auf SPB erzielt hohe Mengen an immobilisierten Proteinen. Damit werden pro Gramm Trägerpartikel hohe Mengen an Enzym immobilisiert, so sind enzymkinetische Untersuchungen mit geringen Mengen an beladenem Latex möglich. Zusammen mit der für auf *annealed brush* immobilisiertem BSA und RNase A festgestellten Konformationserhalt ist dies Grundvoraussetzung für die Untersuchung der SPB bezüglich ihrer Eignung als Immobilisationsträger. Zur Analyse der erhaltenen Adsorptionkurven soll nun die Theorie betrachtet werden.

### *Theoretische Beschreibung der Adsorption:*

Eine Vielzahl von Untersuchungen der Proteinadsorption beschäftigt sich mit der theoretischen Beschreibung der experimentell ermittelten Menge an adsorbiertem Protein. Oft werden hierzu Isothermenmodelle wie z.B. das Langmuir -Modell verwendet (Lee *et al.* 1998, Oh *et al.* 2000).

Die beobachtete Proteinadsorption wird durch die oben erwähnten Modelle meist gut beschrieben, allerdings sind die zu Grunde liegenden Annahmen nicht erfüllt. So liegt kein

reversibles Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und freiem Protein vor, da für die Bestimmung der adsorbierten Menge, das freie Protein abgetrennt wird. Läge ein Gleichgewicht vor, so würde das adsorbierte Protein durch Abtrennen des freien, nicht adsorbierten Proteins wieder desorbieren können. Dies ist vor allem bei den hier untersuchten Systemen nicht der Fall.



**Abb. IV.8:** Schematische Darstellung des Zweistufen-Mechanismus nach Krisdhasima et al. (1993). Es stellt sich zuerst ein reversibles Gleichgewicht (a) zwischen Adsorption und Desorption eines Proteins ein. In einem zweiten, langsameren Schritt (b) bindet das Protein irreversibel an das Substrat. Dies kann entweder wie hier gezeigt durch Deformation erfolgen oder durch Ausbildung von Mehrfachbindungen zum Substrat (Krisdhasima et al. 1993).

Für die Adsorption von verschiedenen Proteinen auf Silikatoberflächen (Krisdhasima et al. 1993) wurde dies mit einem Zweistufen-Mechanismus erklärt (s. Abb. IV.8). Zunächst adsorbiert das Protein reversibel unter weitgehendem Erhalt der nativen Konformation. In einem zweiten, langsamen Prozess wird das Protein irreversibel an das Substrat gebunden. Dies kann z.B. durch Konformationsänderungen des Proteins oder durch Mehrstellenwechselwirkungen mit dem Substrat geschehen. Dadurch würde erklärt werden, warum sich die Ergebnisse trotzdem durch Modelle, die Gleichgewichtsbedingungen voraussetzen, erklären lassen. In diesem Modell finden Konformationsänderungen oder laterale Wechselwirkungen ebenfalls keine Berücksichtigung.

Wittemann konnte in seiner Arbeit zeigen, dass für SPB alle Adsorptionskurven mit dem folgenden Ausdruck beschrieben werden konnten.

$$\tau_{ads} = \frac{\tau_{ads,M} z w_{ads} c_{sol}^{1/n}}{(1 - w_{ads} c_{sol}^{1/n})(1 + z w_{ads} c_{sol}^{1/n} - w_{ads} c_{sol}^{1/n})} \quad (IV-1)$$

- mit  $\tau_{ads}$ : Masse an adsorbiertem Protein pro Gramm Latexpartikel  
 $\tau_{ads, M}$ : Masse an adsorbiertem Protein pro Gramm Latexpartikel, welche einer Monoschichtbelegung der Modelloberfläche entspricht  
 $c_{sol}$ : Konzentration an freiem Protein in Lösung  
 $w_{ads}, z$ : Adsorptionsparameter  
 $n$ : empirischer Parameter

Mit dieser Formel konnten sowohl Adsorption von flexiblen (z.B. BSA) als auch von kompakten Proteinen (z.B. RNase A) beschrieben werden.

### *Herleitung von Gl. IV-1:*

Als Grundlage für die Beschreibung der Adsorptionskurven wurde von einem BET-ähnlichen Modell ausgegangen. Hier wurde angenommen, dass es auf der Adsorption von unabhängigen Teilchenstapeln basiert, aber keine Gleichgewichtsüberlegung voraussetzt. Für die Herleitung des Modells wurde ein Ausschnitt aus der Oberfläche betrachtet. Dort treten einfache und mehrfache Belegung auf.  $N_i$  bezeichnet hierbei die Anzahl der Adsorptionsplätze, auf denen  $i$  Schichten adsorbiert sind. Die Anzahl adsorbierter Proteine innerhalb einer Schicht ist proportional zur Anzahl der zur Verfügung stehenden Adsorptionsplätze  $N_{i-1}$ .

$$N_i \sim N_{i-1} \quad (IV-2)$$

$N_i$ : Anzahl Adsorptionsplätze mit  $i$  Schichten

$N_{i-1}$ : Anzahl Adsorptionsplätze mit  $i-1$  Schichten

Die Adsorptionswahrscheinlichkeit eines Proteinmoleküls ist umso höher, je mehr Protein in Lösung vorhanden ist. Sie ergibt sich somit als Produkt der Konzentration des gelösten Proteins  $c_{sol}$  und einer Konstanten  $w_{ads}$ , welche die Affinität des Proteins zum Substrat bezeichnet. Für die erste Schicht wird eine höhere Adsorptionswahrscheinlichkeit  $z w_{ads} c_{sol}$  ( $z > 1$ ;  $0 \leq z w_{ads} c_{sol} \leq 1$ ) angenommen. Hier soll eine direkte Wechselwirkung zwischen Substrat und Protein Berücksichtigung finden. Dies dient zur Vereinfachung des Modells. Es wird von der Annahme ausgegangen, dass ab der zweiten Schicht eine gleich hohe Adsorptionswahrscheinlichkeit  $w_{ads} c_{sol}$  für alle restlichen Schichten vorliegt.

Somit ergibt sich für die Anzahl der einfach besetzten Plätze aus der Adsorptionswahrscheinlichkeit  $z w_{ads} c_{sol}$  und der Zahl der vorhandenen Adsorptionsplätze  $N_0$ :

$$N_1 = z w_{ads} c_{sol} N_0 \quad (IV-3)$$

bzw.

$$N_i = z (w_{ads} c_{sol})^i N_0 \quad (IV-4)$$

$N_0$ : Anzahl vorhandener Adsorptionsplätze

für die  $i$ -fach ( $i=2, 3, \dots$ ) besetzten Plätze. Die Gesamtmasse an adsorbiertem Protein  $\tau_{ads}$  ist proportional zur Anzahl der adsorbierten Proteinmoleküle:

$$\tau_{ads} \sim \sum_{i=1}^{\infty} iN_i \quad (IV-5)$$

Die Masse  $\tau_{ads, M}$ , welche im Modell einer Monoschichtbelegung entspricht, ist proportional zur Anzahl der Teilchenstapel an der Substratoberfläche:

$$\tau_{ads, M} \sim \sum_{i=1}^{\infty} N_i \quad (IV-6)$$

Damit erhält man:

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads, M}} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} iN_i}{\sum_{i=0}^{\infty} N_i} = zN_0 \frac{\sum_{i=1}^{\infty} i(w_{ads} c_{sol})^i}{N_0 + zN_0 \sum_{i=1}^{\infty} (w_{ads} c_{sol})^i} \quad (IV-7)$$

Nach Umformen unter der Verwendung der Formeln:

$$\sum_{i=1}^{\infty} y^i = \frac{y}{1-y} \quad \text{und} \quad \sum_{i=1}^{\infty} iy^i = \frac{y}{(1-y)^2} \quad \text{mit } y = w_{ads} c_{sol}$$

ergibt sich:

$$\tau_{ads} = \frac{\tau_{ads, M} z w_{ads} c_{sol}}{(1 - w_{ads} c_{sol})(1 + z w_{ads} c_{sol} - w_{ads} c_{sol})} \quad (IV-8)$$

Das Modell unabhängiger Teilchenstapel ist im Zusammenhang mit der Proteinadsorption in *brushes* folgendermaßen zu verstehen. Innerhalb des *brush* besitzen Proteine eine stärkere Wechselwirkung mit den Polymerketten als weiter außen, da die Segmentdichte der Polyelektrolytketten radial nach außen abnimmt. Es stehen im Inneren damit mehr Bindungsstellen mit den Polyelektrolytketten zur Verfügung. Die Schichten des Modells drücken die nach außen hin abnehmende Polymerdichte der Polyelektrolytketten aus. Eine Oberfläche im eigentlichen Sinn wie bei planaren Substraten liegt nicht vor, sondern ist als die Anzahl der Plätze interpretierbar, an denen die Adsorption der Proteine durch Wechselwirkung mit den Polymerketten stattfindet. Je weiter außen die Proteine sich befinden, desto geringer wird die Anzahl der Kontaktstellen. Zusätzlich wird durch die Polydispersität der Ketten die Adsorptionsenergie für äußere Proteine geringer.

Wird  $c_{sol}$  durch  $c_{sol}^{1/n}$  in Anlehnung an die Freundlich-Isotherme (Wedler 1987) ersetzt, kann berücksichtigt werden, dass die Adsorptionswärme abhängig vom Belegungsgrad ist. Es wird Gl. IV-1 erhalten. Die Abnahme der Adsorptionswärme wird als logarithmisch angenommen und findet in der empirischen Konstante  $n$  ihren Ausdruck.

Wird Mehrschichtadsorption ausgeschlossen, d.h. nur eine Schicht wird angenommen ( $i = 1$ ), wird Gleichung IV-9 erhalten:

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads,M}} = \frac{N_1}{N_0 + N_1} = \frac{zw_{ads}c_{sol}}{1 + zw_{ads}c_{sol}} \quad (IV-9)$$

Und durch Substitution von  $zw_{ads}$  durch  $K$ :

$$\frac{\tau_{ads}}{\tau_{ads,M}} = \frac{Kc_{sol}^{1/n}}{1 + Kc_{sol}^{1/n}} \quad (IV-10)$$

Dies entspricht der Langmuir-Isotherme. Wird wie oben beschrieben die Substitution von  $c_{sol}$  durch  $c_{sol}^{1/n}$  durchgeführt wird Langmuir-Freundlich erhalten. In Gl. IV-1 sind also BET-, Langmuir- sowie Langmuir-Freundlich-Modell als Grenzfälle enthalten. Somit ist es möglich mit dieser Gleichung Adsorptionskurven für flexible und kompakte Proteine zu beschreiben.

### IV.3 Ergebnisse der Adsorptionsexperimente

Die experimentellen Daten der Adsorptionsexperimente ließen sich alle durch die vorherigen Kapitel vorgestellten Formeln beschreiben. Dies ist in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen (Wittemann *et al.* 2003, 2004).

Die Auswertung der experimentellen Resultate für die Adsorption von GA ergab, dass diese durch eine BET-ähnliche Adsorptionskurve, die durch Gl. IV-8 beschrieben wird, angepasst werden können. Dies gilt sowohl für den *annealed* als auch für den *quenched brush*. Zudem wurden die Daten noch nach Gl. IV-1 angepasst, damit ein Vergleich aller Adsorptionsexperimente durchgeführt werden konnte. Trotz deutlicher Unterschiede beider Trägersysteme im Art und Zusammensetzung der Polyelektrolytketten und Schalendicke, sind die Unterschiede beider Kurven marginal. Im Gegensatz zu Untersuchungen mit BSA ist kein deutlicher Unterschied zwischen der Adsorption auf einem *annealed* oder *quenched brush* zu erkennen. Auch die Menge an adsorbiertem Enzym ist deutlich geringer als bei der Adsorption von BSA. Ein Grund hierfür ist, dass der *pH*-Wert des gewählten Puffersystems fast drei *pH*-Einheiten vom isoelektrischen Punkt des Enzyms entfernt ist. Untersuchungen von Norde *et al.* (1978) ergaben ein ähnliches Verhalten für die Adsorption von Proteinen. Wittemann *et al.* (2003, 2004) zeigten für *pH*-Werte oberhalb des isoelektrischen Punktes, dass die adsorbierte Menge auf SPB abnimmt, je weiter der *pH*-Wert vom isoelektrischen Punkt entfernt ist. Dies ist auf die steigende Repulsion durch elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen, die der Triebkraft der Adsorption entgegenwirkt. Somit findet für das hier verwendete System nur eine schwache Adsorption statt. Durch die unter

diesen Bedingungen abgeschwächte Triebkraft der Adsorption wird der Unterschied zwischen den Trägerpartikeln nivelliert. Damit erklärt sich das ähnliche Adsorptionsverhalten von GA auf beiden Trägerpartikeln. In Tabelle IV.3 sind die Ergebnisse für die Adsorption von GA auf *annealed* und *quenched brush* zusammengetragen, die nach Gl. IV-8 angepasst wurden. Dies entspricht einem BET-ähnlichen Verlauf. Wie aus Tab. IV.2 zu entnehmen ist, unterscheiden sich beide Adsorptionskurven nur wenig voneinander. Die niedrigen  $z$  und  $w_{ads}$  Werte sprechen für eine geringe Wechselwirkung mit den Trägerpartikeln. Dies ist wahrscheinlich auf die große Differenz zwischen isoelektrischen Punkt und vorliegendem  $pH$ -Wert zurückzuführen.

**Tab.IV.2:** Adsorptionsparameter der adsorbierten Glucoamylase, die durch Anpassung der in Abb. IV.3 und IV.4 dargestellten experimentellen Daten nach Gleichung IV-8 erhalten wurden.

Latex	$\tau_{ads, M}$ [mg/g SPB]	$w_{ads}$ [mL/mg]	$z$
KpS21	$70 \pm 10$	$0,15 \pm 0,03$	$6 \pm 2$
KpSS2	$70 \pm 10$	$0,19 \pm 0,01$	$6 \pm 3$

Für beide verwendeten Glucosidasen (s. Tab. IV.3) lassen sich die Daten nach Gl. IV-10 anpassen. Der große Fehler für die maximal adsorbierbare Menge resultiert daraus, dass keine experimentellen Daten für den Plateaubereich der Adsorptionskurve vorhanden waren. Für die Adsorption von  $\beta$ -D-Glucosidase ist dies auch experimentell nicht möglich, da hier ab 500 mg pro g Trägerpartikel eine Koagulation des Latex auftrat.

**Tab.IV.3:** Adsorptionsparameter, die durch Anpassung der in Abb. IV.5 dargestellten experimentellen Daten nach Gleichung IV-10 erhalten wurden.

Enzym	$\tau_{ads, M}$ [mg/g TP]	$K$	$n$
$\alpha$ -D-Glucosidase	$3300 \pm 700$	$0,15 \pm 0,03$	$1,44 \pm 0,3$
$\beta$ -D-Glucosidase	$800 \pm 100$	$0,06 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,3$

Um alle Enzymadsorptionen zu vergleichen und um die Theorie zu überprüfen, wurden die Adsorptionskurven nochmals mit Gl. IV-1 angepasst, in der alle Modelle vereinigt sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV.4 zusammengefasst. Adsorptionskurven, die nach Langmuir beschrieben werden konnten, liefern dabei große Fehler, da zum einen der Auslauf der Kurve



nicht vorhanden ist, zum anderen zwei der vier Parameter hier lediglich zusätzliche Anpassungsparameter sind. Es ist aber möglich, alle Kurven eindeutig anzupassen.

**Tab.IV.4:** Adsorptionsparameter der adsorbierten Enzyme, die durch Anpassung der experimentell erhaltenen Daten nach Gleichung IV-1 erhalten wurden.

Protein	Latex	pH	$R$ [nm]	$L$ [nm]	$\tau_{ads, M}$ [mg/g SPB]	$z$	$w_{ads}$ [ml/mg]	$n$
GA	KpS21	6,1	55	38	$70 \pm 10$	$6 \pm 2$	$0,15 \pm 0,03$	1
GA	KpSS2	6,1	55	95	$70 \pm 10$	$6 \pm 3$	$0,19 \pm 0,01$	1
$\alpha$ -Glu	KpS21	6,1	55	38	$2200 \pm 500$	$60 \pm 70$	$0,004 \pm 0,004$	$0,5 \pm 0,2$
$\beta$ -Glu	KpS21	7,1	55	42	$640 \pm 330$	$30 \pm 50$	$0,002 \pm 0,004$	$0,41 \pm 0,09$

Die Erklärung für die Unterschiede im Verlauf der Adsorptionskurven liegt wahrscheinlich in der Form bzw. Flexibilität der Proteine. So wurde festgestellt, dass flexible Proteine wie BSA mittels Gl. IV-8 beschrieben werden können. Globuläre Proteine wie z.B. RNase A konnten mit einem Langmuir-Freundlich-Verlauf angepasst werden (Gl. IV-10).

GA besitzt eine flexible Struktur und kann ebenso wie andere flexible Proteine mittels des BET-ähnlichen Modells angepasst werden. Die genaue Struktur der  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucosidase sind nicht bekannt. Allerdings sind die von Czjzek *et al.* (2001) untersuchten  $\beta$ -D-Glucosidasen der Familie I alle globulär. Es ist daher anzunehmen, dass die  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln ebenfalls eine globuläre Struktur besitzt. Die Adsorptionskurve lässt sich mit der Langmuir-Theorie beschreiben.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so kann die Hypothese aufgestellt werden, dass flexible Proteine einen BET-ähnlichen Verlauf haben, da ihre Struktur sich der Umgebung adaptiv anpassen kann. Globuläre Proteine hingegen folgen der Langmuir-Freundlich-Isotherme.

## V. Enzymkinetik

### V.1 Aktivitätsuntersuchungen mittels UV/VIS-Spektroskopie

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Aktivität von immobilisierten Enzymen. Dies erfolgte nach der Michaelis-Menten-Kinetik. Latices wurden nach der Abtrennung freier Enzyme (s. Kap. VII.1.6) untersucht. Je nach Enzym musste ein anderes Substrat verwendet werden. Für die Untersuchung mittels UV/VIS-Spektroskopie wurden Substrate gewählt, deren Produkte spektroskopisch nachweisbar waren, ohne dass der Test durch die Latexpartikel gestört wurde. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte durch zeitabhängige Messungen der Extinktion (s. Kap. VII.3.6). Damit eine Auswertung möglich war, musste die Änderung der Extinktion mit der Zeit annähernd konstant bleiben. Die Werte wurden erst von der 4. Minute an ausgewertet, damit eine ausreichende Zeit für die Einstellung der Reaktion verblieb. Für die Auswertung wurde nach folgender Formel die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet:

$$v = \frac{\Delta E_{405nm}}{\Delta t \epsilon(405nm)} \quad (V-1)$$

mit  $v$ : Reaktionsgeschwindigkeit  
 $\Delta E_{ads} / \Delta t$  Änderung der Extinktion bei 405 nm pro Zeiteinheit  
 $\epsilon(405nm)$ : molare dekadische Extinktionskoeffizient bei 405 nm

Nach Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$  wurden die Ergebnisse nach Michaelis-Menten angepasst. Als kinetische Parameter wurden Michaelis-Konstante  $K_M$  und die maximale Geschwindigkeit  $v_{max}$  erhalten. Zur Berechnung von  $k_{cat}$  wurde die vorliegende Enzymkonzentration  $E$  durch folgenden Ausdruck berechnet.

$$E = \frac{FG}{100} \frac{\tau_{ads}}{(1000 + \tau_{ads})} * \frac{1000}{X} \quad (V-2)$$

mit  $FG$ : Feststoffgehalt in %  
 $\tau_{ads}$ : Masse an adsorbiertem Protein pro Gramm Latexpartikel  
 $X$ : Verdünnungsfaktor

Mit bekannter Enzymkonzentration  $[E]$  und  $v_{max}$  kann  $k_{cat}$  berechnet werden. Allerdings wird in dieser Arbeit  $k_{cat}$  in Abweichung zur Standardangabe mit der Einheit  $\text{mmol}/(\text{g} \cdot \text{min})$  angegeben. Als Vergleich für die Werte der immobilisierten Enzyme wurde das native Enzym im entsprechenden Reaktionsmedium gemessen.

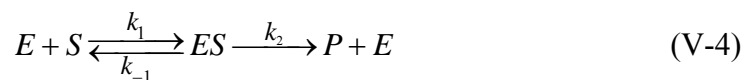
### V.1.1 Michaelis-Menten-Kinetik:

Die Funktion eines Enzyms ist die Katalyse einer chemischen Reaktion. Die Theorie zur Beschreibung dieser Kinetik wurde von Henri, Michaelis und Menten aufgestellt. Die zentrale Gleichung dieser Theorie wird als Michaelis-Menten-Gleichung (V-3) bezeichnet (Copeland 2000).

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{V-3})$$

mit  $v$ : Reaktionsgeschwindigkeit  $[\text{mol}/(\text{Lmin})]$   
 $[S]$ : Substratkonzentration  $[\text{mol}/\text{L}]$   
 $K_M$ : Michaelis-Konstante  $[\text{mol}/\text{L}]$   
 $v_{\max}$ : maximale Geschwindigkeit  $[\text{mol}/(\text{Lmin})]$

Für die Herleitung dieser Gleichung wird folgender einfacher Reaktionsverlauf angenommen:



Hier bilden Enzym und Substrat im ersten Schritt mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  einen Enzym-Substrat-Komplex (ES-Komplex), der wieder mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  zerfallen kann. Auf diesen folgt dann ein zweiter, geschwindigkeitsbestimmender Schritt mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$ , bei dem Substrat in Produkt umgewandelt und Enzym wieder freigesetzt wird. Die Umsetzung des ES-Komplexes ist wesentlich langsamer als die Rückreaktion ( $k_{-1} \gg k_2$ ).

Für die Lösung des Problems müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Während der Anfangsphase dürfen keine andere Intermediate als der ES-Komplex gebildet werden, damit die gesamte Enzymkonzentration  $[E]$  aus der freien Enzymkonzentration  $[E]_f$  und der Konzentration der ES-Komplex  $[ES]$  berechnet werden kann.

$$[E] = [E]_f + [ES] \quad (\text{V-5})$$

Des Weiteren muss die Substratkonzentration  $[S]$  sehr viel größer als die Enzymkonzentration  $[E]$  sein ( $[S] \gg [E]$ ), damit die freie Substratkonzentration als ungefähr gleich angenommen werden kann ( $[S]_f \sim [S]$ ). Als letzte Bedingung muss in der Anfangsphase die Konzentration des ES-Komplexes  $[ES]$  durch Bildung und Zerfall konstant bleiben, damit

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (\text{V-6})$$

gilt und ein stationärer Zustand (*steady state*) vorliegt. Unter diesen Annahmen verallgemeinerten Briggs und Haldane die Herleitung von Michaelis und Menten (Copeland 2000).

Für die Bildung und den Zerfall des ES-Komplexes lassen sich folgende Gleichungen aufstellen.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f \quad (\text{V-7}) \quad \text{und} \quad -\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (\text{V-8})$$

Unter der Annahme des quasistationären Zustands mit Gl. V-6 und Umstellen nach  $[ES]$  wird

$$[ES] = \frac{[E]_f[S]_f}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (\text{V-9})$$

erhalten. Wird nun die Michaelis-Konstante

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{V-10})$$

eingeführt,  $[E]_f$  und  $[S]_f$  ersetzt, ergibt sich:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \quad (\text{V-11})$$

Mit  $v = k_2[ES]$  für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung wird

$$v = k_2[E] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{V-12})$$

bzw.

$$v = k_{cat}[E] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{V-13})$$

erhalten, wenn Gl. V-4 verallgemeinert und statt der einfachen Produktbildung mit  $k_2$  eine Reihe von Einzelreaktionen mit der Gesamtgeschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$  angenommen wird. Wird  $[S]$  gegen unendlich erhöht, so strebt die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen eine

maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$ . Nun wird  $k_{cat}[E]$  durch  $v_{max}$  ersetzt und die Michaelis-Menten-Gleichung (V-3) erhalten.

Abweichungen von diesem Verhalten können durch Inhibition auftreten. Hier sei als Beispiel die Substratinhibition genannt. Diese tritt bei hohen Substratkonzentrationen auf und ist auf die Ausbildung eines inaktiven, ternären Substrat-Enzym-Substrat-Komplex zurückzuführen. Durch Einführung einer Inhibierungskonstanten  $K_i$  wird der Inhibition mit folgendem Ausdruck Rechnung getragen [Copeland 2000]:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S] \left( 1 + \frac{[S]}{K_i} \right)} \quad (V-14)$$

$K_M$  und  $v_{max}$  werden als kinetische Parameter bezeichnet, obwohl nur  $K_M$  von der eingesetzten Enzymmenge unabhängig ist.  $v_{max}$  hingegen ist von der Enzymkonzentration abhängig. Um Werte für unterschiedliche Enzymkonzentrationen bei gleichen Reaktionsbedingungen zu vergleichen, ist  $k_{cat}$  die geeignete Größe.

Die Michaelis-Konstante ist gleichbedeutend mit der Substratkonzentration, für die gerade die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.  $K_M$  ist zudem ein Maß für die Affinität zwischen Substrat und Enzym. Desto größer  $K_M$  ist, desto kleiner ist die Affinität.  $k_{cat}$  wird als Wechselzahl bezeichnet und hat die Einheit einer reziproken Zeit. Sie gibt an, wie viele Umwandlungen pro Zeiteinheit und Enzym stattfinden.

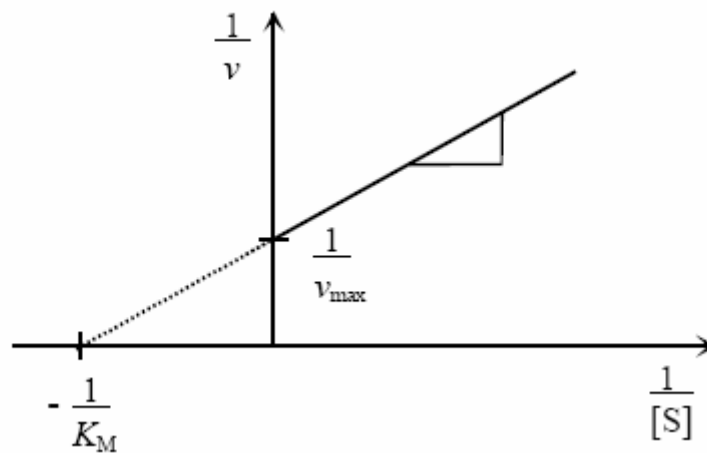
Der Vergleich von  $K_M$  und  $k_{cat}$  Werten gestaltet sich schwierig, da diese von  $pH$ -Wert, Ionenstärke, Temperatur, Substrat und Co-Enzymkonzentration abhängen. Deshalb müssen die Reaktionsbedingungen genau eingestellt werden, um einen Vergleich durchführen zu können. Problematisch bleibt, dass unterschiedliche Chargen des gleichen Enzyms unterschiedliche  $K_M$  und  $k_{cat}$  Werte besitzen können.

Die Angabe der Aktivität eines Enzyms bezieht sich deshalb oft auf eine aktive Menge an Enzym. Zumeist wird diese noch in den alten Maßeinheiten Internationale Einheiten (I.E.) oder Unit (U) angegeben. Sie bezeichnen die Menge an Enzym, die bei 25°C ein  $\mu\text{mol}$  eines Substrates pro Minute umwandelt. Als neue SI-Einheit wird katal (kat) verwendet und bezeichnet die Enzymmenge, die bei optimalen Bedingungen ein Mol Substrat pro Sekunde umwandelt. Diese Art der Aktivitätsangabe wird verwendet, da oft die genaue Enzymkonzentration nicht bekannt ist bzw. besonders in technischen Prozessen nur die wirksame Menge entscheidend ist.

### *Datenanalyse:*

Für die Bestimmung der Enzymaktivität werden für verschiedene Substratkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeiten nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt

(Copeland 2000). Am Anfang einer Reaktion ist die Konzentration des Produktes wesentlich kleiner als die Substratkonzentration ( $[P] \ll [S]$ ), also kann die Bildung des Produktes als quasi-linear mit der Zeit angenommen werden, d.h. am Anfang der Reaktion ist  $v = \frac{d[P]}{dt}$  linear. Für die Auswertung dieser Datenpunkte müssen diese mittels der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst werden. Dies erfolgt durch ein Programm, das die Parameter  $K_M$  und  $v_{max}$  anpasst.



**Abb. V.1:** Schematische Darstellung der Lineweaver-Burk-Auftragung: Hierfür wird die reziproke Substratkonzentration gegen die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Der Ordinatenabschnitt entspricht der reziproken maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, aus dem Abszissenabschnitt ergibt sich die reziproke negative Michaelis-Konstante.

Für die Vereinfachung der Darstellung und Auswertung wurden diverse Linearisierungsmethoden entwickelt (Copeland 2000, Bisswanger 2000). Stellvertretend für alle diese Methoden soll hier die Lineweaver-Burk-Auftragung vorgestellt werden (Abb. V.1). Hier wird die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit  $1/v$  gegen die reziproke Substratkonzentration  $1/[S]$  aufgetragen und es wird Gl. V-15 erhalten:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (\text{V-15})$$

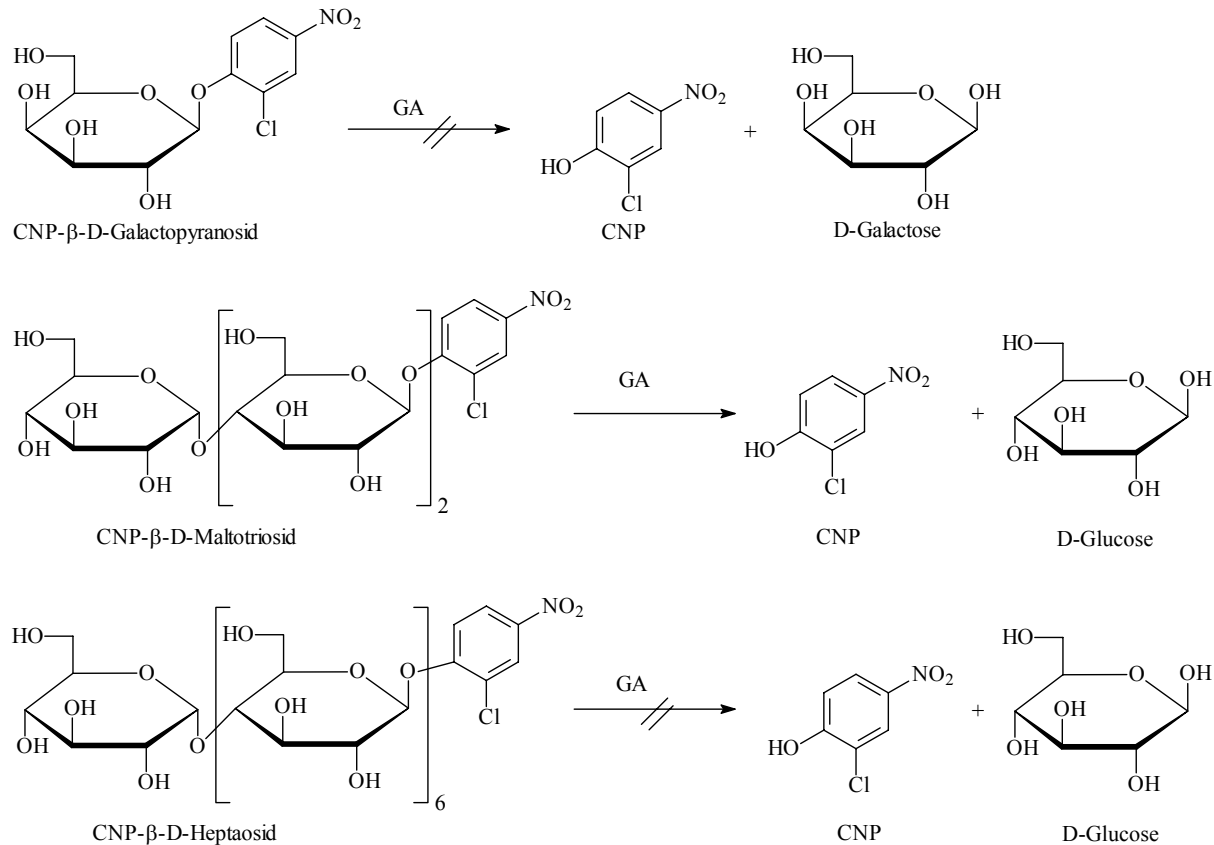
Die Auswertung nach dieser Methode ist ungenauer als die direkte Analyse der Daten, da Werte für niedrige Substratkonzentrationen, die mit den größten Fehlern behaftet sind, durch die reziproke Auftragung das Ergebnis am meisten beeinflussen.

Für die Auswertung in dieser Arbeit wurde nur die direkte Analyse der Daten nach Michaelis-Menten durchgeführt. Für die Auftragung und bildliche Darstellung eignet sich ein Lineweaver-Burk-Diagramm aber ausgezeichnet, da Abweichungen vom idealen Verhalten

leicht erkennbar sind. Zudem sind die kinetischen Parameter leicht aus einem solchen Diagramm herauszulesen, da  $1/v_{max}$  dem Ordinatenabschnitt und  $-1/K_M$  dem Abszissenabschnitt entspricht.

### V.1.2 Glucoamylase

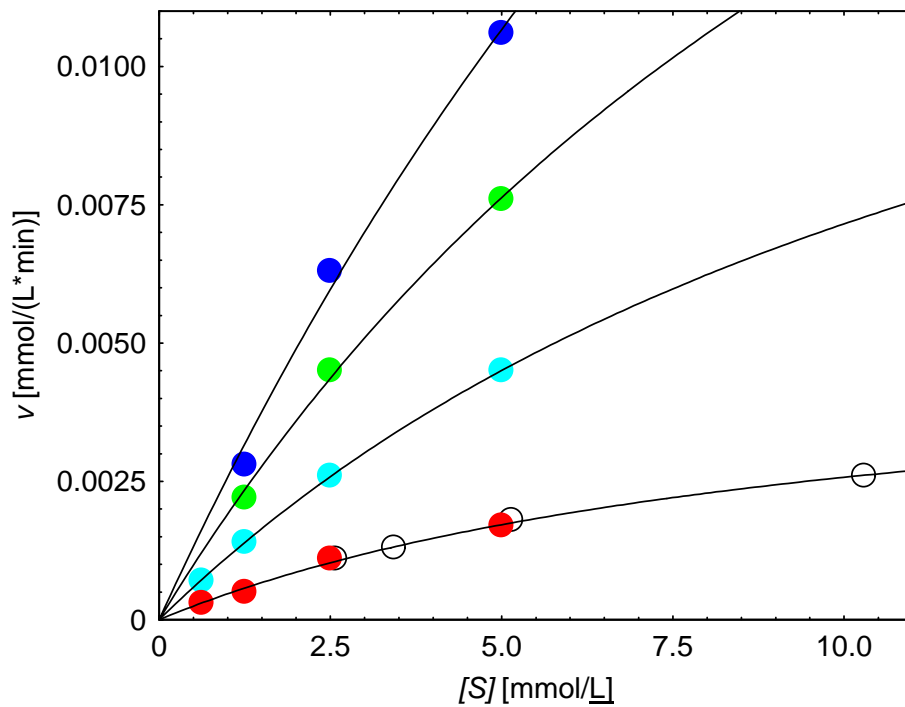
Glucoamylase setzt aus  $\alpha$ -Glycosiden D-Glucose frei. Zur Bestimmung der Enzymaktivität, wird die freigesetzte D-Glucose nachgewiesen. Ein Standardtest hierfür ist der Nachweis mit einem gekoppelten Enzymsystem aus Glucoseoxidase und Peroxidase bei 420 nm (Matsumura *et al.* 1988, Stellmach 1988). Für die Experimente mit SPB kam dies nicht in Frage, da die dabei verwendeten Enzyme ebenfalls mit den SPB wechselwirken und somit das Ergebnis verfälschen. Für die Aktivitätsbestimmung wurden zwei Oligomaltoside 2-Chloro-4-Nitrophenyl-(CNP)- $\beta$ -D-Maltoheptaosid (Henkel *et al.* 1984) und CNP- $\beta$ -D-Maltotriosid eingesetzt. Ersteres wird in Standardverfahren für die Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität verwendet. CNP- $\beta$ -D-Galactopyranosid wurde ebenfalls auf seine Eignung als Substrat für die Aktivitätsbestimmung untersucht. Lediglich CNP- $\beta$ -D-Maltotriosid zeigte eine messbare Aktivität (Abb.V.2) und eignete sich als Substrat für die enzymkinetischen Untersuchungen für Glucoamylase.



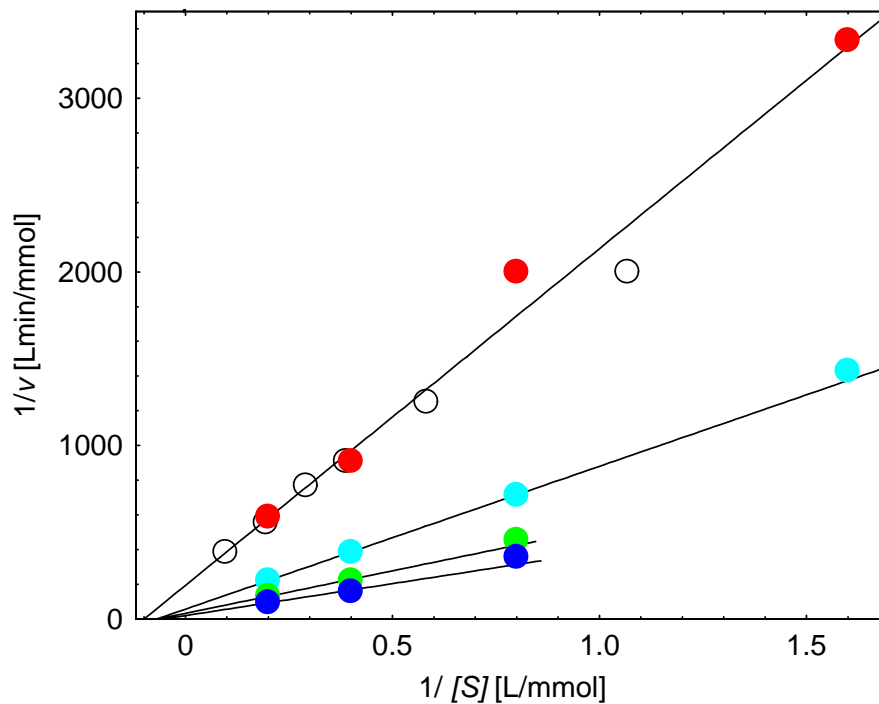
**Abb. V.2:** Enzymkinetische Untersuchung zur Ermittlung eines geeigneten Substrates. CNP-β-D-Galactopyranosid (obere Reaktionsgleichung) und CNP-β-D-Maltoheptaosid (untere Reaktionsgleichung) werden nicht durch Glucoamylase umgesetzt. CNP-β-D-Maltotriosid wird in D-Glucose und CNP, das bei 405 nm nachgewiesen wird, gespalten (Mitte).

Untersucht wurden ausgewählte Proben der im vorherigen Kapitel beschriebenen Adsorptionsisothermen. Sowohl für *annealed* (Abb.V.3) als auch für *quenched brush* (Abb.V.5) konnte eine Kinetik nach Michaelis-Menten angepasst werden. Die daraus abgeleiteten Lineweaver-Burk-Diagramme sind in Abb.V.4 (*annealed brush*) bzw. Abb.V.6 (*quenched brush*) dargestellt. Da CNP-β-D-Maltotriosid nur in geringen Mengen zur Verfügung stand, wurden pro Messreihe nur vier Messpunkte aufgenommen. Dies führt zu größeren Fehlern bei  $K_M$  und  $v_{max}$  im Vergleich zu den Ergebnissen bei α-D-Glucosidase und β-D-Glucosidase. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle V.1 (*annealed brush*) und Tabelle V.2 (*quenched brush*) zusammengefasst.

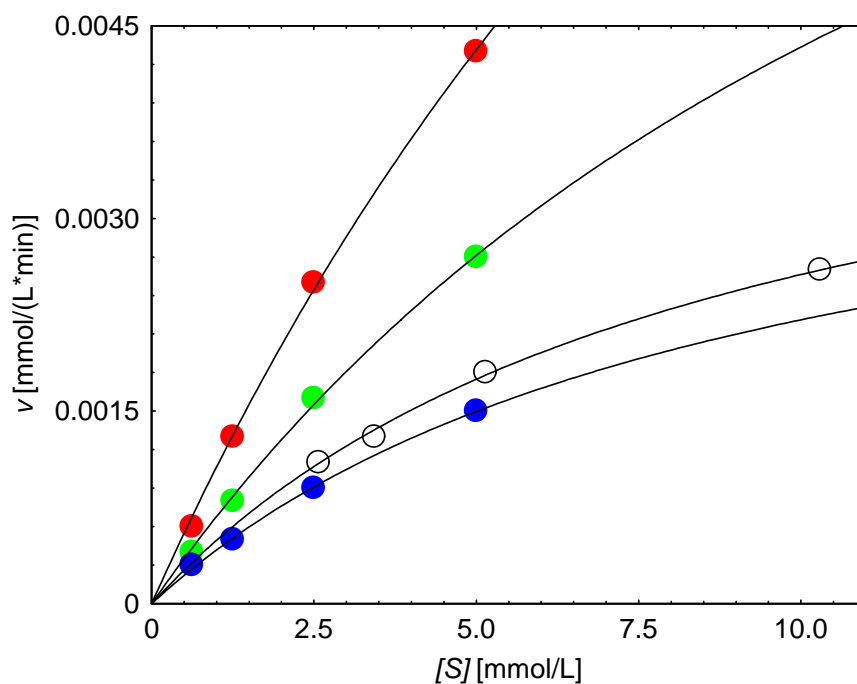




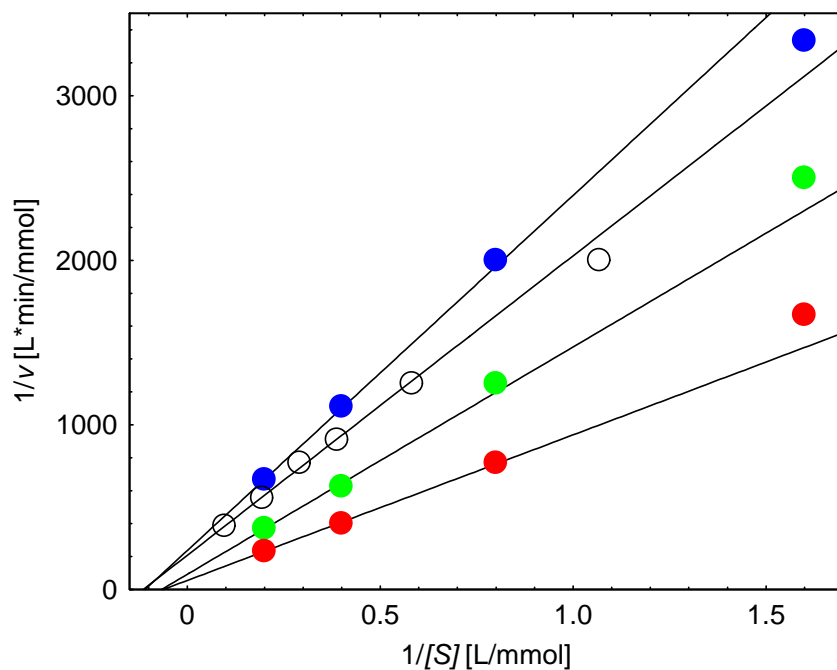
**Abb. V.3:** Michaelis-Menten-Diagramm für adsorbierte Glucoamylase von *Aspergillus niger* auf KpS21 (annealed brush): natives Enzym (offener Kreis), 28 mg/g SPB (rot) 80 mg/g SPB (türkis), 204 mg/g SPB (grün), 232 mg/g SPB (blau).



**Abb. V.4:** Lineweaver-Burk-Diagramm für adsorbierte Glucoamylase aus *Aspergillus niger* auf KpS21 (annealed brush): natives Enzym (offener Kreis), 28 mg/g SPB (rot) 80 mg/g SPB (türkis), 204 mg/g SPB (grün), 232 mg/g SPB (blau).



**Abb. V.5:** Michaelis-Menten-Diagramm für adsorbierte Glucoamylase aus *Aspergillus niger* auf KpSS2 (quenched brush): natives Enzym (offener Kreis), 15 mg/g SPB (blau) 47 mg/g SPB (grün), 79 mg/g SPB (rot).



**Abb. V.6:** Lineweaver-Burk-Diagramm für adsorbierte Glucoamylase aus *Aspergillus niger* auf KpSS2 (quenched brush): natives Enzym (offener Kreis), 15 mg/g SPB (blau) 47 mg/g SPB (grün), 79 mg/g SPB (rot).

**Tab. V.1:** Aktivität der auf annealed brush immobilisierten Glucoamylase.

$\tau_{ads}$ [mg GA/g SPB]	$K_M$ [mmol/L]	$v_{max}$ [mmol/(L*min)]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]
0 (natives Enzym)	$9 \pm 3$	$0,5 \cdot 10^{-2}$	7
23	$10 \pm 3$	$0,2 \cdot 10^{-2}$	0,6
28	$11 \pm 3$	$0,5 \cdot 10^{-2}$	1,1
80	$13 \pm 3$	$1,7 \cdot 10^{-2}$	1,1
97	$18 \pm 3$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	1,0
108	$18 \pm 3$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	1,5
160	$15 \pm 3$	$4,7 \cdot 10^{-2}$	1,2
204	$15 \pm 3$	$3,1 \cdot 10^{-2}$	0,7
232	$18 \pm 3$	$4,8 \cdot 10^{-2}$	0,9

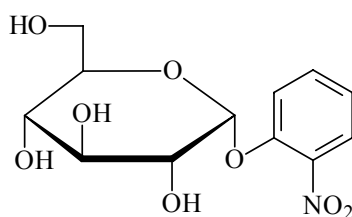
**Tab. V.2:** Aktivität der auf quenched brush immobilisierten Glucoamylase.

$\tau_{ads}$ [mg GA/g SPB]	$K_M$ [mmol/L]	$v_{max}$ [mmol/(L*min)]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]
15	$11 \pm 3$	$0,5 \cdot 10^{-2}$	1,7
47	$14 \pm 3$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	1,0
48	$14 \pm 3$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	1,1
79	$16 \pm 3$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	1,2
85	$16 \pm 3$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	1,5
96	$13 \pm 3$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	0,9

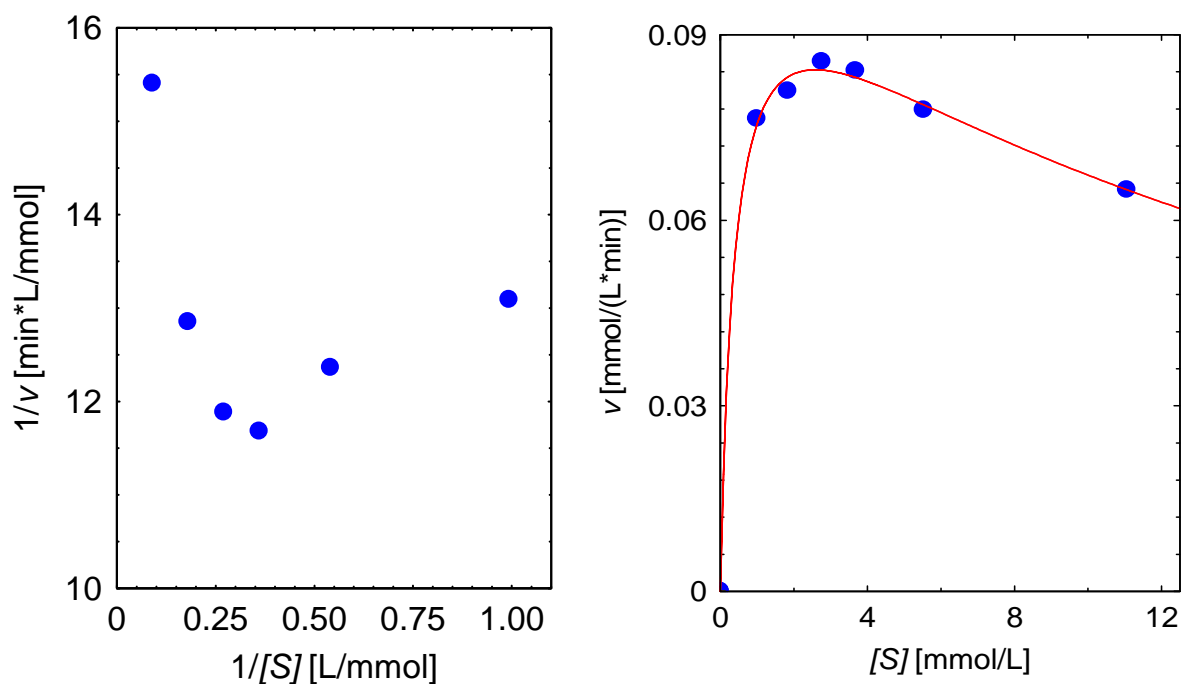
Zusätzlich wurde ein Test mit Stärke als hochmolekulares Substrat durchgeführt. Dies diente als Nachweis, dass immobilisiertes Enzym auch bei Substraten mit höherer Molekularmasse aktiv blieb. In diesem Test wird freigesetzte Glucose komplexiert und der entstehende Komplex bei 540 nm nachgewiesen (Robyt *et al.* 1972, Williamson *et al.* 1992). Allerdings konnten mit dieser Methode aus experimentellen Gründen nur Einpunktmessungen durchgeführt werden. Somit war eine Aufstellung einer Kinetik nach Michaelis-Menten nicht möglich.

### V.1.3 $\alpha$ -D-Glucosidase

Für  $\alpha$ -D-Glucosidase konnte ein Standardtest angewendet werden (O'Donnell *et al.* 2004). Hier wird 2-Nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranosid (Abb. V.7) glycosidisch gespalten und das entstehende Chromophor 2-Nitrophenol spektroskopisch verfolgt. Im Gegensatz zu CNP- $\beta$ -D-Maltotriosid hat dieses einen geringeren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$ , deshalb muss eine höhere Substratkonzentration verwendet werden, um die Enzymkinetik zu verfolgen können. Im Bereich hoher Substratkonzentrationen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit für das freie Enzym wieder ab. Im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. V.8) ist deutlich die Abweichung vom idealen Verhalten zu beobachten. Dies ist auf die vorher beschriebene Substratinhibition zurückzuführen. Substratinhibition ist bei vielen Enzymen zu beobachten (Meyer *et al.* 1981, Decker *et al.* 2001). Untersuchungen der adsorbierten Enzyme zeigten, dass für niedrige Belegungsgrade (<200 mg/g SPB) keine Untersuchungen möglich waren, da keine messbare Aktivität vorhanden war. Für hohe Belegungsgrade (> 1200 mg/g SPB) folgte die Aktivität nicht mehr der Michaelis-Menten-Kinetik, da dort die Voraussetzungen hierfür durch die hohe Enzymkonzentration innerhalb des *brush* nicht mehr gegeben sind. Für einen Belegungsgrad von etwa 400 mg/g SPB konnte die Auswertung vorgenommen werden, diese sind in Tab. V.3 aufgelistet. Die gemessenen  $K_M$ -Werte für immobilisierte und native Enzyme sind im Rahmen des Fehlers identisch. Auffallend ist der starke Abfall der  $k_{cat}$ -Werte, die nur 5% des ursprünglichen Wertes betragen.



**Abb. V.7:** Struktur von 2-Nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranosid, das als Substrat für die enzymkinetische Bestimmung der  $\alpha$ -D-Glucosidase benutzt wurde.



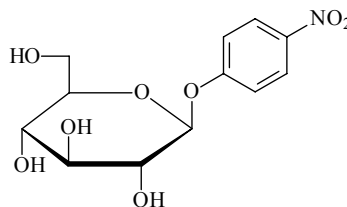
**Abb. V.8:** Lineweaver-Burk-Diagramm für native  $\alpha$ -D-Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (links). Daneben ist das dazugehörige Michaelis-Menten-Diagramm abgebildet, die Anpassung erfolgte nach Gl. V-14.

**Tab. V.3:** Aktivität der auf annealed brush immobilisierten  $\alpha$ -D-Glucosidase.

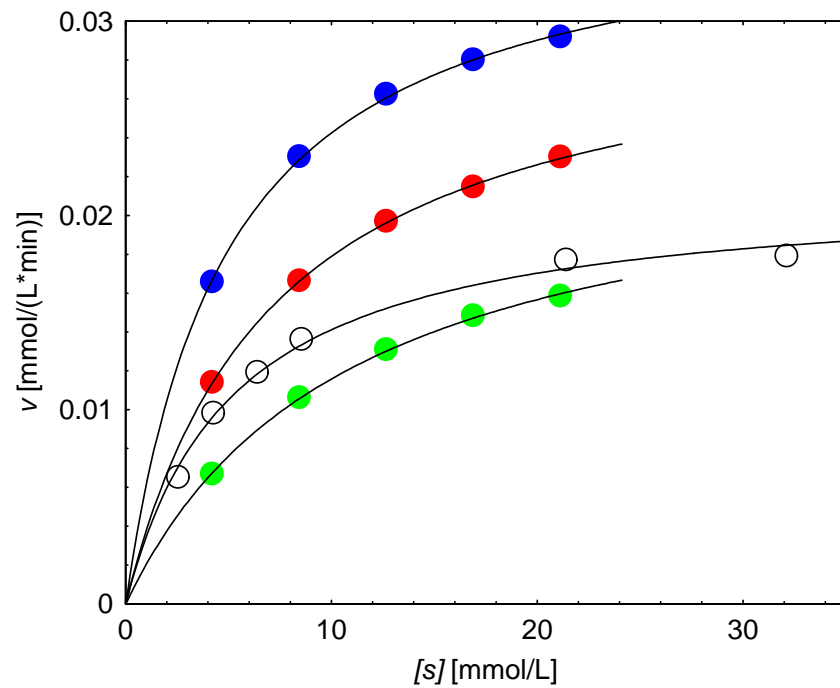
$\tau_{ads}$ [mg $\alpha$ -Glu/g SPB]	$K_M$ [mmol/L]	$v_{max}$ [mmol/(L*min)]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]	$K_i$ [mmol/L]
0 (natives Enzym)	$0,4 \pm 0,1$	0,11	2,3	16
353	$0,7 \pm 0,2$	$0,7 \cdot 10^{-2}$	0,13	4,3
359	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \cdot 10^{-2}$	0,05	1,4
450	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \cdot 10^{-2}$	0,05	4,5

## V.1.4 $\beta$ -D-Glucosidase

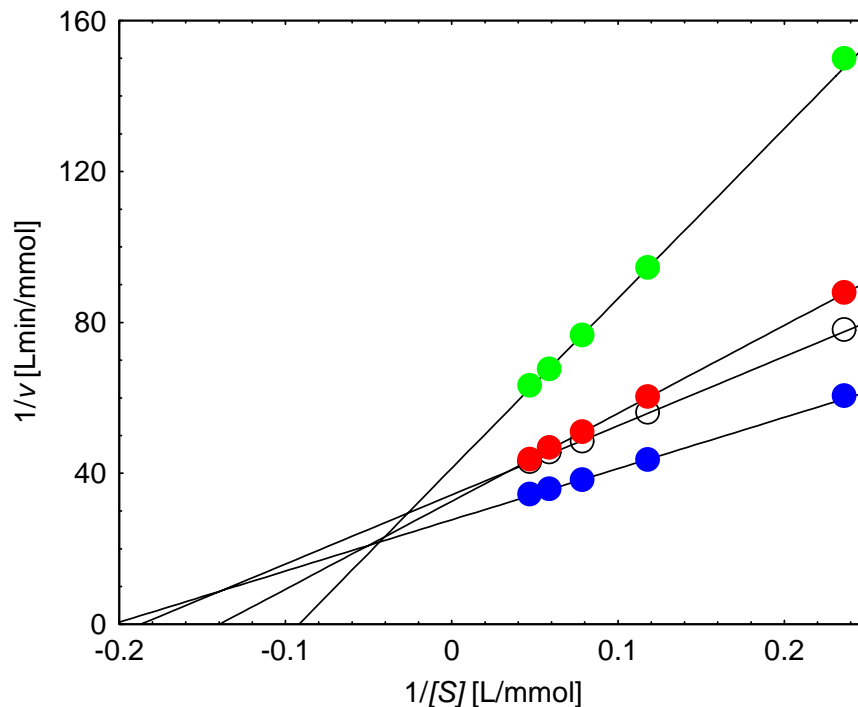
Für die enzymkinetischen Untersuchungen von  $\beta$ -D-Glucosidase wurde 4-Nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranosid (Abb. V.9) als Substrat verwendet (Grover *et al.* 1977, Decker *et al.* 2001, Kaper *et al.* 2002). Es hat ebenso wie das für  $\alpha$ -D-Glucosidase verwendete Substrat einen wesentlich geringeren Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu CNP- $\beta$ -D-Maltotriosid, wodurch höhere Konzentrationen verwendet werden mussten. Die Untersuchung wurde an *annealed brush* Partikeln durchgeführt. Für verschiedene Belegungsgrade sind die erhaltenen Werte als Michaelis-Menten- (Abb. V.10) und Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. V.11) abgebildet. Sämtliche Ergebnisse sind in Tab. V.4 dargestellt. Mit steigender Belegung nähern sich die beobachteten  $K_M$ -Werte denen des nativen Enzyms an.



**Abb. V.9:** Struktur von 4-Nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranosid, das als Substrat für die enzymkinetische Bestimmung der  $\beta$ -D-Glucosidase benutzt wurde.



**Abb. V.10:** Michaelis-Menten-Diagramm für adsorbierte  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln auf KpS21 (annealed brush): natives Enzym (offener Kreis), 15 mg/g SPB (grün) 47 mg/ g SPB (rot), 79 mg/ g SPB (blau).



**Abb. V.11:** Lineweaver-Burk-Diagramm für adsorbierte  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln auf KpS21 (annealed brush): natives Enzym (offener Kreis), 15 mg/g SPB (grün) 47 mg/ g SPB (rot), 79 mg/ g SPB (blau).

**Tab. V.4:**     *Aktivität der auf annealed brush immobilisierten  $\beta$ -D-Glucosidase.*

$\tau_{ads}$ [mg $\beta$ -Glu/g SPB]	$K_M$ [mmol/L]	$v_{max}$ [mmol/(L*min)]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]
0 (natives Enzym)	$6 \pm 1$	$2,7 \cdot 10^{-2}$	10
32	$11 \pm 1$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	4,3
53	$12 \pm 1$	$0,6 \cdot 10^{-2}$	1,4
133	$6 \pm 1$	$5,8 \cdot 10^{-2}$	4,5
219	$7 \pm 1$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	1,9
268	$6 \pm 1$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	4,0
286	$7 \pm 1$	$1,7 \cdot 10^{-2}$	6,1
312	$6 \pm 1$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	5,6
324	$6 \pm 1$	$4,3 \cdot 10^{-2}$	7,9
447	$5 \pm 1$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	3,0
452	$5 \pm 1$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	2,4
580	$5 \pm 1$	$3,3 \cdot 10^{-2}$	4,4

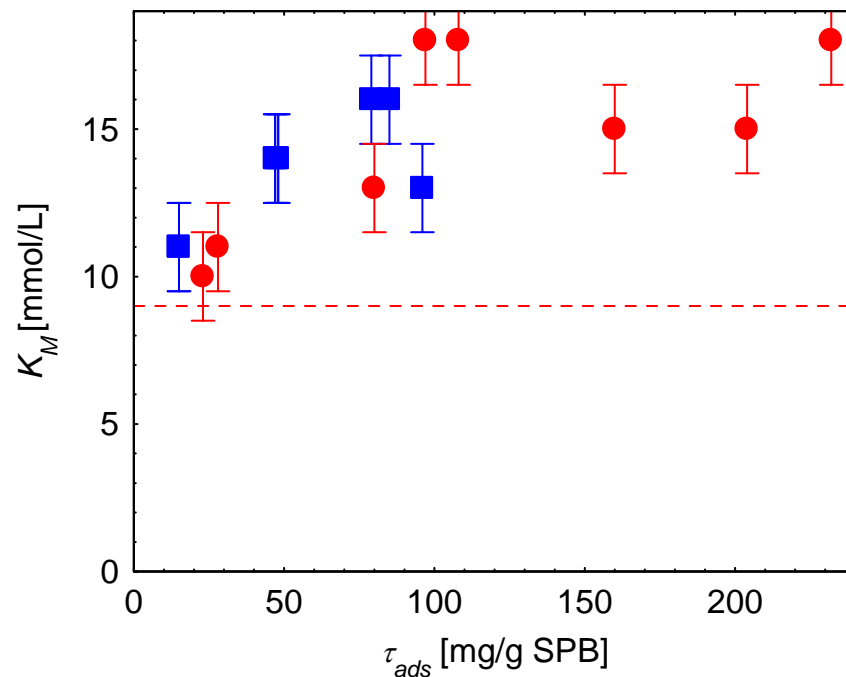
### V.1.5                      Diskussion der Resultate

Werden die Ergebnisse der drei untersuchten Enzyme miteinander verglichen, ist zu erkennen, dass die  $K_M$ -Werte der nativen Enzyme nur wenig von denen der immobilisierten Enzyme abweichen. Allerdings sind für alle Enzyme die erhaltenen  $k_{cat}$ -Werte abgesenkt.

Für die Immobilisation von Glucoamylase kann kein Unterschied der Aktivität der auf *annealed* bzw. auf *quenched brushes* (Abb. V.12) immobilisierten Enzyme festgestellt werden. Der für beide Systeme zu beobachtende leichte Anstieg der Michaelis-Konstante mit

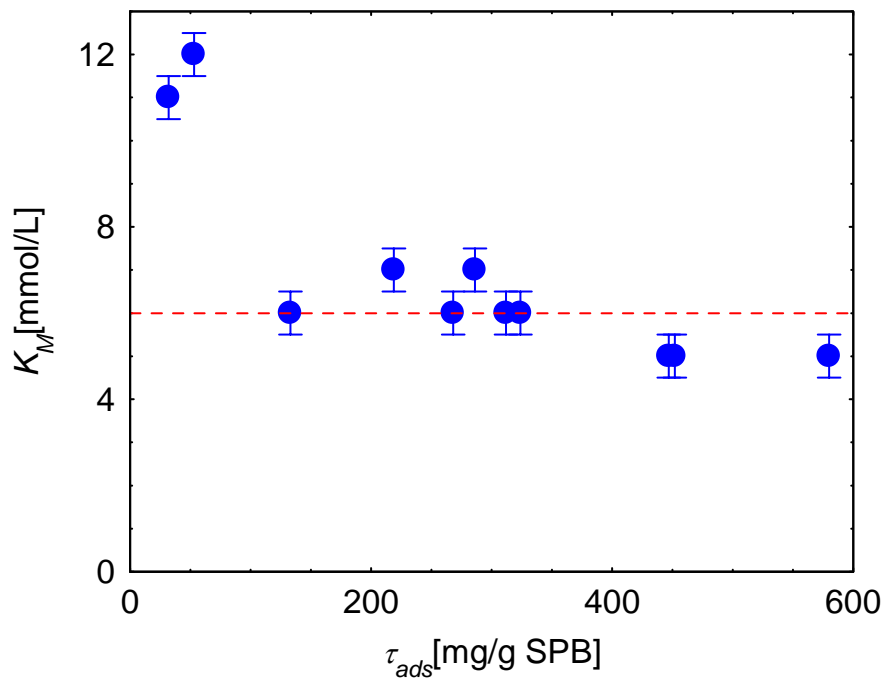


steigender Belegung der Partikel ist aufgrund des Fehlers von  $\pm 3$  mmol/L nicht signifikant genug, um dies als Trend bei steigendem Beladungsgrad zu werten.



**Abb. V.12:** Abhängigkeit der Michaelis-Konstante  $K_M$  von Glucoamylase von der Belegung  $\tau_{ads}$ . (Rote Kreise: annealed brush; blaue Quadrate: quenched brush) Als Vergleich ist der  $K_M$ -Wert des nativen Enzyms als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Für die Aktivitätsbestimmung von  $\alpha$ -D-Glucosidase wurden wenige Werte bestimmt. Eine Analyse von Werten bei niedrigem  $\tau_{ads}$  wird durch den niedrigen Extinktionskoeffizienten des Produkts und einem  $K_M$ -Wert von 0,4 mmol/L experimentell erschwert. Zusätzlich folgt bei höherer Beladung die Enzymaktivität nicht mehr der Michaelis-Menten-Kinetik. Dies führt dazu, dass auf die Auswertung eines Trends über einen größeren Bereich der Beladung durch Enzym verzichtet wurde. Werden die  $K_M$ -Werte für  $\beta$ -D-Glucosidase in Abhängigkeit mit  $\tau_{ads}$  (Abb. V.13) betrachtet, so kann eine Abnahme dieser mit steigendem Beladungsgrad festgestellt werden. Bei hoher Belegung der Partikel ist die Michaelis-Konstante des nativen und des immobilisierten Enzyms identisch.



**Abb. V.13:** Abhängigkeit der Michaelis-Konstante  $K_M$  von  $\beta$ -D-Glucosidase von der Belegung  $\tau_{ads}$ . Als Vergleich ist der  $K_M$ -Wert des nativen Enzyms als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen nun mit der Literatur verglichen werden. So bestimmten Oh *et al.* (2000) für auf PS/PSS Partikel immobilisierte Glucoamylase mit steigender Beladung eine starke Erhöhung des  $K_M$ -Wertes. Andere Immobilisationsversuche von Enzymen ergaben zum Teil um Größenordnungen erhöhte Werte (Arica *et al.* 1998). Handa *et al.* (1982) erhielten so z.B. für die kovalente Immobilisation von  $\alpha$ -Amylase eine Erhöhung des  $K_M$ -Wertes um den Faktor 100. Eine Erhöhung von  $K_M$  bedeutet, dass die Affinität zwischen Substrat und Enzym erniedrigt wird. Dies ist besonders der Fall, wenn durch die Immobilisation eine Konformationsänderung des Enzyms auftritt. Ein weitgehender Erhalt des  $K_M$ -Wertes deutet darauf hin, dass keine diese Affinität beeinflussende Konformationsänderung stattfindet. Dies wäre im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen von Wittemann *et al.* (2004), die bei immobilisiertem BSA eine Konformationsänderung durch Adsorption auf *brush*-Partikel ausschließen konnten.

Die Bewertung der zweiten enzymkinetischen Konstanten ist schwieriger.  $k_{cat}$  erhält man aus der Division der experimentell ermittelten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  durch die eingesetzte Enzymkonzentration. In der Literatur werden viele Experimente beschrieben, bei denen die Enzymkonzentration nicht bestimmbar war bzw. nicht bestimmt wurde. Die Aktivität wird daher in Units angegeben, da gerade für technische Anwendungen nur der Umsatz von Interesse ist. Hier kann keine Aussage über einen Aktivitätsverlust oder -gewinn

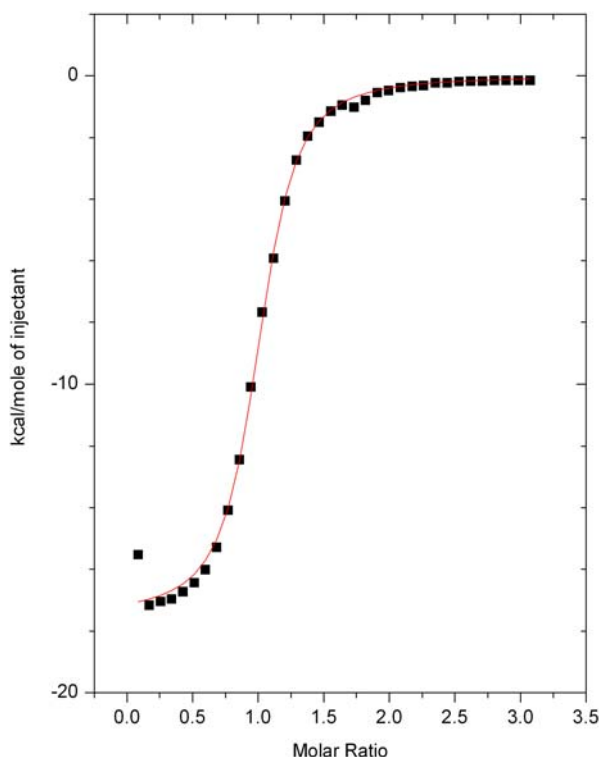
getroffen werden. Im vorliegenden Fall wird für die Bestimmung der Enzymkonzentration diese aus Gl. V-2 berechnet. Es fließt somit eine Vielzahl an experimentellen Größen, die mit Fehlern behaftet sind, ein. Wie aus den vorliegenden Daten zu entnehmen ist, folgen die gemessenen  $k_{cat}$ -Werte keinem Trend. Da die  $K_M$ -Werte annähernd gleich bleiben, kann ein Aktivitätsverlust durch Konformationsänderung ausgeschlossen werden. In anderen Arbeiten wird der Verlust an Aktivität durch Diffusionseffekte in vernetzten Systemen oder porösen Oberflächen erklärt (Sun *et al.* 1999). Das hier verwendete System ist diesen Effekten jedoch nicht unterworfen. Betrachtet man jedoch den  $pH$ -Wert innerhalb eines *brush*, so ist dieser im Gegensatz zum äußeren  $pH$ -Wert abgesenkt (Biesheuvel *et al.* 2005). Eine einfache Rechnung mit dem  $pK_a$ -Wert der Polyacrylsäureketten und der Annahme, dass etwa die Hälfte dieser Ketten dissoziiert sind, ergeben einen  $pH$ -Wert von 4,6 (Witemann *et al.* 2003). Allerdings herrscht innerhalb des *brush* ein  $pH$ -Gradient, so dass nach außen der  $pH$ -Wert sich dem des Puffersystems annähert. Die Aktivität von Enzymen ist vom vorherrschenden  $pH$ -Wert abhängig. Ein Grund für die Abnahme der  $k_{cat}$ -Werte könnte daher ein niedrigerer  $pH$ -Wert im Innern des *brush* sein, durch den die Aktivität von weiter innen liegenden Enzymmolekülen erniedrigt wird. Dies würde im Fall der  $\alpha$ -D-Glucosidase, die im Verhältnis zu den anderen verwendeten Enzymen starke Absenkung von  $k_{cat}$  erklären, da diese für  $pH$ -Werte unterhalb von 5 im verwendeten Test nicht mehr aktiv ist. Weiterhin zeigte gereinigte Glucoamylase zudem bei gleichem  $K_M$  einen um 30% geringeren  $k_{cat}$ -Wert im Vergleich zum ungereinigten Enzym, d.h. durch Einflüsse während der Adsorptionsexperimente und anschließender Reinigung kann somit eine Absenkung von  $k_{cat}$  bewirkt werden, die nicht auf die Wechselwirkungen zwischen *brush*-Partikeln und Enzymen zurückzuführen ist.

## V.2. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

### V.2.1 Voruntersuchungen

Als zweite Methode zur Untersuchung von immobilisierten Enzymen wurde ein isothermer Titrationskalorimeter (VP-ITC, Microcal) verwendet. Hierzu wurde eine enzymhaltige Probe vorgelegt und mit Substratlösung titriert. Die genaue Versuchsdurchführung und Grundlagen der Theorie sind in Kap. VII.3.7 beschrieben. Vor der Verwendung des Geräts musste dieses mit Standardmessungen überprüft werden. Hierzu diente die Untersuchung der 1:1 Komplexierung von RNase A mit 2'-Cytidin Monophosphat (2'CMP) in 50mM Kaliumacetat-Puffer bei  $pH$  5,5 und 30°C (Abb. V.14). Die Anpassung der Werte erfolgt nach der in Kap. VII.3.7 beschriebenen Theorie. Ein Vergleich mit den Messergebnissen des Herstellers (s.

Tab. V.5) zeigt, dass die erhaltenen Ergebnisse innerhalb der vorgegebenen Fehlertoleranzen liegen und somit die Funktionsfähigkeit des Gerätes gewährleistet ist.



**Abb. V.14:** Messkurve für die Titration von RNase A mit 2'-Cytidin Monophosphat (2'CMP) in 50mM Kaliumacetat-Puffer bei pH 5,5 und 30°C. Die rote Linie kennzeichnet die Anpassung der experimentellen Daten.

**Tab. V.5:** Vergleich der vom Hersteller angegebenen Werte mit denen durch eigene Messungen für die Titration von RNase A mit 2'-Cytidin Monophosphat (2'CMP) in 50mM Kaliumacetat-Puffer bei pH 5,5 und 30°C erhaltenen. Als Parameter sind hier  $N$ , die Bindungsstöchiometrie,  $K$ , die Bindungskonstante,  $\Delta H$ , die Bindungsenthalpie, und  $\Delta S$ , die Bindungsentropie, angegeben.

Messparameter	Gemessener Wert	Herstellerangabe
$N$	$9,982 \pm 0,007$	$9,9515 \pm 0,0014$
$K [M^{-1}]$	$7,5 \cdot 10^5 \pm 6 \cdot 10^4$	$7,17 \cdot 10^5 \pm 1,3 \cdot 10^4$
$\Delta H [cal/mol]$	$-1,7 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$-1,754 \cdot 10^4 \pm 0,4 \cdot 10^3$
$\Delta S [cal/mol]$	-30,8	-31,05

Für die Untersuchung mittels ITC ist es wichtig, dass  $pH$ -Wert und Ionenstärke der Probe und des Titors übereinstimmen, da sonst eine Verfälschung der Messergebnisse stattfindet. Um dies zu vermeiden, wurde für die untersuchten Systeme die Pufferlösung einmal angesetzt und für alle Messungen verwendet.

## V.2.2 Aktivitätsuntersuchungen

Mittels ITC wurden freie und immobilisierte Enzyme untersucht. Die bei der Reaktion freiwerdende Wärme ist bei konstanter Temperatur und konstantem Druck wie folgt gegeben (Ladbury *et al.* 2004, Bianconi 2003, Todd *et al.* 2001):

$$q = n\Delta H_{app} = [P]_{tot} V \Delta H_{app} \quad (V-15)$$

mit  $\Delta H_{app}$ : molare Reaktionsenthalpie (J/mol)  
 $[P]_{tot}$ : Gesamtkonzentration des Produkts (mol/L)

Die Messgröße ist die Änderung der Wärme pro Zeit, somit ergibt sich:

$$\frac{dq}{dt} = \frac{d[P]_{tot}}{dt} V \Delta H_{app} \quad (V-16)$$

und nach Umstellen nach der Reaktionsgeschwindigkeit  $v = \frac{d[P]_{tot}}{dt}$ :

$$v = \frac{1}{V \Delta H_{app}} \frac{dq}{dt} \quad (V-17)$$

Die Substratkonzentration  $[S]$  kann bei Einzelmessungen nach folgender Formel berechnet werden.

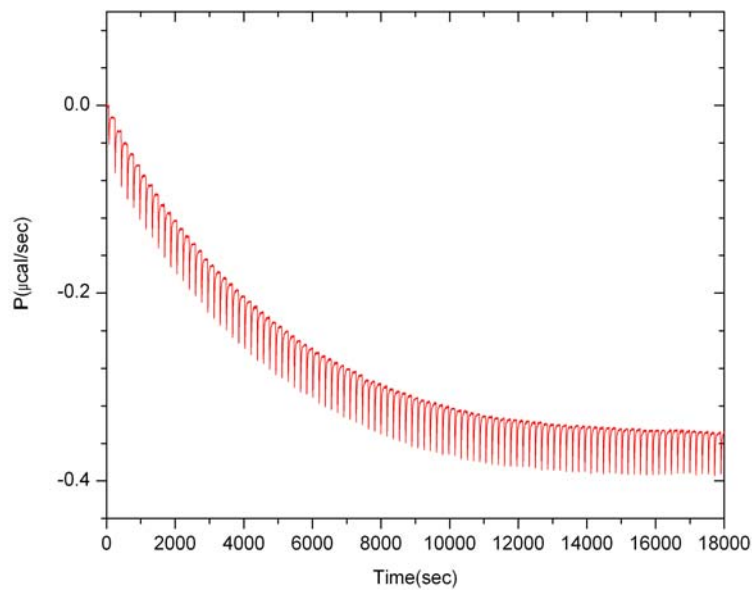
$$[S]_{tot} = [S]_0 - \frac{1}{V \Delta H_{app}} \int_0^t \frac{dq}{dt} dt \quad (V-18)$$

$\Delta H_{app}$  musste experimentell bei bekanntem  $[S]$  zuerst nach folgender Formel bestimmt werden.

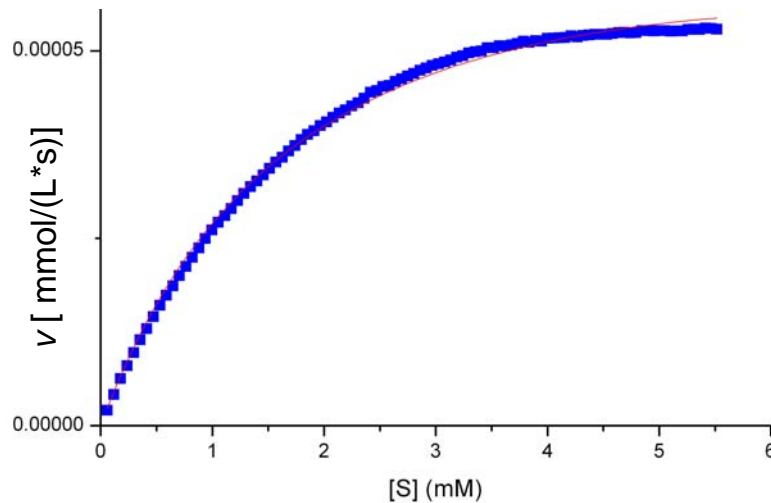
$$\Delta H_{app} = \frac{1}{V[S]} \int_0^\infty \frac{dq}{dt} dt \quad (V-19)$$

Dies geschieht durch eine einmalige Zugabe einer bekannten Menge Substrat. Die Kenntnis von  $\Delta H_{app}$  dient zur Berechnung von  $k_{cat}$ ,  $K_M$  wird von diesem Wert nicht beeinflusst. Zur Untersuchung der Enzymaktivität wurde dann durch Mehrfachinjektionen von Substrat eine

Enzymkinetik aufgenommen. Hier werden nach Gl. V-18 die Reaktionsgeschwindigkeit bei bekannter Substratkonzentration gemessen. Die erhaltenen Werte werden nach Michaelis-Menten-Kinetik ausgewertet. Für die Messungen muss  $[S] \gg [E]$  gelten, damit die Voraussetzung erfüllt ist, dass die Substratkonzentration während der Messung eines Punktes ungefähr konstant bleibt. Dafür müssen die Konzentration so gewählt werden, dass höchstens 5% des vorhandenen Substrats umgesetzt wird. Mittels ITC wurden sowohl in Puffer gelöste als auch immobilisierte  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucosidase untersucht. In Abb. V.15 und Abb. V.16 ist die Messung für in Puffer gelöste  $\beta$ -D-Glucosidase und die daraus erhaltene Michaelis-Menten Auftragung dargestellt.



**Abb. V.15:** Messkurve für die Titration von in Puffer gelöste  $\beta$ -D-Glucosidase mit 4-Nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranosid bei 25°C.



**Abb. V.16:** Die aus Abb. V.15 ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit ist hier gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die rote Linie kennzeichnet die Anpassung der experimentellen Daten nach Michaelis-Menten.

## V.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Zuerst wurden native Enzyme untersucht, um einen Vergleich mit den Ergebnissen aus der UV/VIS-Spektroskopie zu erhalten. Je nach Enzym wurde die Konzentration zwischen  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  mM gewählt, so konnte sichergestellt werden, dass nur wenig Substrat umgesetzt wurde. Wird ein zu hoher Substratumsatz während der Messung erzielt, wird ein zu niedriges  $K_M$  erzielt. Dies kann aber leicht aus den Messdaten erkannt werden. Es wurden mindestens zwei Messungen pro Enzym durchgeführt, um eine bessere Statistik zu erhalten. Als Messtemperatur wurde 25°C gewählt und für die Messungen nicht variiert. Die Bestimmung von  $\Delta H_{app}$  ergab als Mittelwert für  $\alpha$ -D-Glucosidase -1300 cal/mol und für  $\beta$ -D-Glucosidase -4200 cal/mol. In Tabelle V.6 sind die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen zusammengefasst und mit den Werten, die durch UV/VIS-Messungen erhalten wurden, verglichen.

**Tab. V.6:** Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchung von nativen Enzymen mittels ITC. Die gemittelten  $k_{cat}$ - und  $K_M$ -Werte sind im Vergleich zu den durch UV/VIS-Spektroskopie erhaltenen Werte dargestellt.

Enzym	$K_M$ [mmol/L]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]	Methode
$\alpha$ -Glu	$1,3 \pm 0,3$	$4 \pm 1$	ITC
$\alpha$ -Glu	$0,4 \pm 0,1$	2,3	UV/VIS
$\beta$ -Glu	$2,7 \pm 0,6$	$6 \pm 2$	ITC
$\beta$ -Glu	$6 \pm 1$	$10 \pm 1$	UV/VIS

Der Vergleich der aus beiden Methoden erhaltenen  $K_M$ -Werte zeigt, dass diese voneinander abweichen. Allerdings muss beachtet werden, dass für die Bestimmung durch unterschiedliche Methoden nie die gleichen Bedingungen vorherrschen. So wurden verschiedene Substratchargen und Pufferlösungen verwendet. Zudem wurden die Messungen für die unterschiedlichen Methoden nicht zur gleichen Zeit durchgeführt. Todd *et al.* (2001) untersuchten systematisch verschiedene Enzyme mittels UV/VIS-Spektroskopie und ITC. Die dabei beobachteten Abweichungen für die mit verschiedenen Methoden gemessenen  $K_M$ -Werte entsprechen denen in dieser Arbeit festgestellten Unterschiede, die durch Verwendung unterschiedlicher Substrat- und Enzymchargen, Messbedingungen und Messmethoden zu Stande kommen.

Für die gemessenen  $k_{cat}$ -Werte trifft dies ebenfalls zu, sie stimmen qualitativ gut überein. Allerdings wurden größere Abweichungen bei Messung gleicher Proben beobachtet. Auch bei der Bestimmung von  $\Delta H_{app}$  trat dies auf. Für die Bestimmung beider Parameter ist die Kenntnis der genauen Enzymkonzentration sehr wichtig, da diese sehr gering ist. Dadurch ergeben sich durch Verdünnungsfehler größere Abweichungen für die Messungen. Dies wurde schon bei UV/VIS-Messungen festgestellt. So können die  $k_{cat}$ -Werte nur eingeschränkt zur Bewertung der untersuchten Systeme herangezogen werden. Zudem können zusätzlich Unterschiede im Vergleich zu UV/VIS-Messungen auftreten, da mit  $\Delta H_{app}$  die komplette Enthalpie bestimmt wird. Ist diese nicht identisch mit der Enthalpie der Enzymreaktion, so weichen die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden voneinander ab. Todd *et al.* (2001) beschrieben dies für Heparin.

Für die Untersuchung immobilisierter Enzyme wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucosidase auf KpS21 (*annealed brush*) adsorbiert. Die mit Enzym beladenen Partikel wurden mit dem entsprechendem Dispersionsmedium verdünnt, so dass die Substratkonversion gering genug



war, damit diese für jeden Messpunkt als konstant angenommen werden konnte. Für  $\beta$ -D-Glucosidase wurden Proben für mittlere und hohe Beladungen angesetzt und vermessen. Da durch UV/VIS-Messungen nur enzymkinetische Werte für eine Beladung um die 400 mg/g TP für einen Vergleich zur Verfügung standen, wurde für  $\alpha$ -D-Glucosidase nur eine Probe mittels ITC untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. V.7 zusammengefasst.

**Tab. V.7:** *Ergebnisse der enzymkinetischen Untersuchung von immobilisierten Enzymen mittels ITC.*

Enzym	$\tau_{ads}$ [mg/g TP]	$K_M$ [mmol/L]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]
$\alpha$ -Glu	490	$1,2 \pm 0,3$	$0,16 \pm 0,03$
$\beta$ -Glu	165	$7,7 \pm 0,7$	$6 \pm 2$
$\beta$ -Glu	295	$6,0 \pm 0,2$	$13 \pm 1$
$\beta$ -Glu	554	$4 \pm 1$	$5 \pm 1$

Immobilisation von  $\alpha$ -D-Glucosidase beeinflusst den  $K_M$ -Wert nicht, dieser bleibt im Rahmen des Fehlers identisch. Der  $k_{cat}$ -Wert hingegen wird stark auf 4% des ursprünglichen Wertes abgesenkt. Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die durch UV/VIS-Spektroskopie erhalten wurden. Die Ursache für die starke Absenkung der Aktivität wurde bereits weiter oben diskutiert.

Werden die  $K_M$ -Werte für immobilisierte  $\beta$ -D-Glucosidase betrachtet, so ist festzustellen, dass sich diese für steigende Beladung der Michaelis-Konstante des nativen Enzyms annähern. Dies entspricht dem Gang der  $K_M$ -Werte wie er durch UV/VIS-Spektroskopie beobachtet wurde. Die mittels ITC ermittelten  $k_{cat}$ -Werte sind entweder gleich dem  $k_{cat}$  des nativen Enzyms oder sogar größer. Dies würde den bisherigen Messergebnissen widersprechen. Ein möglicher Grund hierfür könnten Fehler bei der Bestimmung der Enzymkonzentration oder ein nicht zur eigentlichen Enzymreaktion gehörender Prozess sein.

Mittels ITC kann ebenso wie mittels UV/VIS-Spektroskopie eine Untersuchung von nativen und immobilisierten Enzymen vorgenommen werden. Die Ergebnisse beider Methoden stimmen im Rahmen der Fehler für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen miteinander überein, sie liefern für  $K_M$ -Werte immobilisierter Enzyme gleiche Trends. Eine Diskussion von  $k_{cat}$  gestaltet sich auch für die mittels ITC erhaltenen Werte schwierig. Generell wird durch die größere Anzahl von Messpunkten bei der ITC ein geringerer Fehler für die kinetischen Parameter erhalten. ITC eignet sich somit für die Aktivitätsbestimmung von

immobilisierten Proteinen und hat den zusätzlichen Vorteil, dass keine speziellen Tests benötigt werden.

## VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die adsorptive Immobilisation von Enzymen auf kolloidalen Partikeln untersucht. Diese Trägerpartikel bestehen aus einem Polystyrolkern auf den Polymerketten durch eine *grafting from*-Technik angeknüpft wurden. Sie werden als sphärische Polyelektrolytbürsten bezeichnet. Für die Synthese der Trägerpartikel wurden zunächst mit einer Photoinitiatorschicht versehene Polystyrolkerne mit enger Teilchengrößenverteilung durch Zweistufenemulsionspolymerisation dargestellt. Anschließend wurde durch Photoemulsionspolymerisation aus wasserlöslichen Monomeren wie Acrylsäure oder Natriumstyrolsulfonat Polyelektrolytketten auf diese Kerne polymerisiert. Die Parameter dieser Partikel wie der Kernradius  $R$ , die Konturlänge  $L_C$  und die Oberflächendichte der Polymerketten  $\sigma$  lassen sich gezielt über die Synthese einstellen. Durch die hohe Oberflächendichte wird ein so genannter *brush* erhalten, d.h. eine Schicht von Polymerketten, die fest an eine Oberfläche geknüpft sind und deren benachbarten Ketten sich deutlich überlappen. *Brushes*, die aus schwachen Polyelektrolyten aufgebaut sind, werden als *annealed brushes* bezeichnet. Der Dissoziationsgrad der geladenen Gruppen ist hier vom *pH*-Wert abhängig. Von einem *quenched brush* wird gesprochen, wenn die Ketten aus starken Elektrolyten aufgebaut sind. Hier ist der Dissoziationsgrad unabhängig vom *pH*-Wert. Liegen keine Fremdsalzionen vor, so sind die Gegenionen der Polyelektrolytketten innerhalb des *brush* gefangen. Dies führt zu einem hohen osmotischen Druck, durch den die Ketten bis fast an ihre Konturlänge gestreckt werden. In diesem Fall wird von einem *osmotic brush* gesprochen.

Für die hier durchgeführten Adsorptionsexperimente wurden drei verschiedene Enzyme verwendet: Glucoamylase,  $\alpha$ -D-Glucosidase und  $\beta$ -D-Glucosidase. Die Adsorption erfolgt trotz gleichnamiger Ladung der Trägerpartikel und der Enzyme. Als Triebkraft dieser Adsorption wurde die so genannte *counterion release force* diskutiert: Die positiv geladene Bereiche eines überwiegend negativ geladenen Enzyms wechselwirken mit negativ geladenen Ketten eines *brush*. Das zu adsorbierende Protein besitzt  $N^+$  positive und  $N^-$  negative Ladungen. Durch die Adsorption werden nun je  $N^+$  Gegenionen des Enzyms und der Polymerketten frei gesetzt, aber auch  $N^-$  Gegenionen in den *brush* aufgenommen. Somit werden  $2N^+ - N^-$  Gegenionen frei gesetzt und erhöhen die Entropie.

Für die Beschreibung der Adsorptionskurven wurde ein Modell entwickelt, das als Grenzfälle die Langmuir-, Langmuir-Freundlich- und Brunnauer-Emmet-Teller-Theorie enthält. Allerdings wurde hier nicht von reversiblen Gleichgewichtszuständen ausgegangen. Die Adsorption von flexiblen Enzymen folgte einem Brunnauer-Emmet-Teller-Verlauf. Ein Langmuir-Freundlich Verlauf wurde bei der Adsorption von globulären Proteinen beobachtet. Für alle eingesetzten Enzyme ließen sich große Mengen immobilisieren, z.B. bis zu 2,4 g Enzym pro g Trägerpartikel für  $\alpha$ -D-Glucosidase. Die Immobilisation von Glucoamylase lieferte sowohl für ein *annealed*- als auch für ein *quenched brush*-System übereinstimmende Ergebnisse. Dies kann mit der im Vergleich zur Adsorption von Rinderserum Albumin geringeren Wechselwirkung zwischen Glucoamylase und dem *brush* erklärt werden.

Die so adsorbierten Enzyme wurden bezüglich ihrer Aktivität untersucht, wobei die Ergebnisse mittels Michaelis-Menten-Kinetik ausgewertet wurden. Diese liefert die Parameter Michaelis-Konstante  $K_M$ , die ein Maß für die Affinität zwischen Substrat und Enzym ist, und die Wechselzahl  $k_{cat}$ , die den Umsatz an Substrat pro Enzym und Zeit angibt. Als Untersuchungsmethoden standen UV/VIS-Spektroskopie und isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Verfügung. Aktivitätsuntersuchungen von gelösten Enzymen unter gleichen Bedingungen dienten hier als Vergleich für die immobilisierten Enzyme. Untersuchungen von Glucoamylase ergaben, dass die  $K_M$ -Werte für immobilisierte Enzyme sich nicht signifikant im Vergleich zur Michaelis-Konstante des nativen Enzyms ändern. Sowohl für ein *annealed* als auch für ein *quenched brush*-System konnte dies gezeigt werden. Dies zeigt, dass die Adsorption eine geeignete Immobilisationsmethode ist, da so die Aktivität des Enzyms erhalten bleibt. Untersuchungen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucosidase wurden sowohl mittels UV/VIS-Spektroskopie als auch mittels ITC durchgeführt. Es wurde hier ebenfalls ein Erhalt der enzymatischen Aktivität gefunden. Für  $\beta$ -D-Glucosidase konnte beobachtet werden, dass die  $K_M$ -Werte mit steigender Beladung sich dem des nativen Enzyms annähern und für höchste Beladungen identisch sind. UV/VIS-Spektroskopie und ITC liefern vergleichbare Daten. ITC eignet sich somit als Untersuchungsmethode für die Enzymaktivität.

Die Wechselzahl der immobilisierten Enzyme war in allen Messungen herabgesetzt. Dies bedeutet, dass das Enzym weniger Substrat pro Zeiteinheit umsetzt. Besonders ausgeprägt war dieser Abfall für  $\alpha$ -D-Glucosidase. Da  $K_M$  erhalten bleibt und Konformationsuntersuchungen anderer adsorbierter Proteine zeigten, dass die Adsorption nicht zu starken Konformationsänderungen führt, kann dieser Aktivitätsverlust nicht durch Störung der Konformation auftreten. Die verringerte Aktivität ist auf zur Vergleichsmessung unterschiedliche Bedingungen zurückzuführen. So ist der *pH*-Wert innerhalb des *brush* abgesenkt und die Ionenstärke erhöht. Es herrschen für innerhalb des *brush* adsorbierte Enzyme veränderte Bedingungen, die sich nach außen hin denen in Lösung angleichen. Enzyme, deren Aktivität für niedrige *pH*-Werte abgesenkt ist, erniedrigen somit  $k_{cat}$ .  $\alpha$ -D-

Glucosidase ist z.B. für  $pH$ -Werte kleiner als fünf nicht mehr im verwendeten Test aktiv. Zudem zeigten Untersuchungen, dass  $k_{cat}$  abhängig von der Vorbehandlung des Enzyms ist.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch Adsorption von Enzymen eine hohe Beladung der sphärischen Polyelektrolytbürsten möglich ist. Durch diese einfache Vorgehensweise konnten mit Enzym beladene Trägerpartikel erhalten werden, die enzymatisch aktiv waren. Die  $K_M$ -Werte blieben erhalten. Somit eignen sich sphärische Polyelektrolytbürsten ideal als Trägerpartikel für die Immobilisation von Enzymen.

## Summary

The present work describes the immobilisation of enzymes on colloidal particles by adsorption. The colloidal particles consist of polystyrene core particles onto which polyelectrolyte chains are attached by grafting-from technique. The particles are referred to as spherical polyelectrolyte brushes. At first, polystyrene-core particles with a thin layer of photoinitiator and narrow size distribution were synthesised by emulsion polymerisation. Afterwards, polyelectrolyte chains are grafted by polymerisation of water-soluble monomers like acrylic acid or sodium styrenesulfonate onto the core using photoemulsion polymerisation. The important parameters of resulting particles, the core radius  $R$ , contour length  $L_C$  of the grafted polyelectrolytes and grafting density of the polymer chains  $\sigma$  can be adjusted by synthesis. Due to the high grafting density a spherical brush is generated. The term brush denotes a system where the average lateral distances between the polyelectrolyte chains are considerably smaller than their contour length. The brushes bearing weak polyelectrolytes as chains are denoted as annealed brushes. In this case the degree of dissociation of the charged groups is dependent on the  $pH$  value. If the brush consists of strong electrolytes it is denoted as quenched brush. The degree of dissociation is independent on the  $pH$  value. In the absence of added salt the counterions of the polyelectrolyte chains are confined within the brush. The confined counterions render a high osmotic pressure stretching the chains almost to their contour length.

The adsorption experiments were conducted using the enzymes: glucoamylase,  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucosidase. The adsorption takes place despite the fact that the carrier particles as well as the enzymes are charged negatively. The so called counterion release force is discussed as driving force of the adsorption. The protein possesses  $N^+$  positive and  $N^-$  negative charges. Here, the positively charged patches of an overall negatively charged enzyme interact with the negatively charged chains of a brush. During adsorption  $N^+$  counterions of the enzyme and  $N^+$  counterions of the polymer chains are released but  $N^-$  counterions are confined into the brush. Therefore,  $2 N^+ - N^-$  counterions are released resulting in an increase in entropy.

A model was developed to describe the adsorption curves. This model contains the Langmuir, Langmuir-Freundlich and Brunauer-Emmett-Teller theory as limiting cases. In contrast to the mentioned theories, an equilibrium state was not assumed. Adsorption of flexible enzymes is

described with a Brunauer-Emmett-Teller-like behaviour. Whereas the adsorption of globular proteins is described by Langmuir-Freundlich-like behaviour. High amounts of immobilisation could be achieved for every used enzyme, e.g. up to 2.4 g per g carrier particle for  $\alpha$ -D-glucosidase. Immobilisation of glucoamylase provides similar results for an annealed and a quenched brush system. This can be explained by a weaker interaction between glucoamylase and brush compared to the adsorption of bovine serum albumin.

In further research, the activity of the adsorbed enzymes was measured. The results were analysed by Michaelis-Menten kinetics. The Michaelis-Menten kinetic model provides the Michaelis constant  $K_M$ , which is a measure of the affinity between the substrate and the enzyme. The second parameter, the turnover number  $k_{cat}$ , is the number of substrate converted per enzyme and per time. The studies were conducted using UV/VIS-spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC). All the activity measurements of dissolved enzymes were carried out under the same conditions. The activity measurements of glucoamylase showed that  $K_M$  values of immobilised enzyme did not change significantly compared to the Michaelis constant of dissolved enzyme. These results showed that adsorption is an appropriate immobilisation procedure due to the preserved enzymatic activity. Using both annealed and quenched brushes as carrier systems showed no loss in enzyme activity. The activity measurements of  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-glucosidase were conducted with UV/VIS-spectroscopy and ITC. The preservation of the enzymatic activity is observed also for these studies. For  $\beta$ -D-glucosidase, the  $K_M$  values converge with increased loading of the particles with the values of the dissolved enzyme. They are identical at highest loadings. The measurements by ITC and UV/VIS-spectroscopy provide comparable data. Hence, in addition to UV/VIS spectroscopy, ITC is also a suitable method for determination of enzymatic activity.

The turnover number decreases for all the measurements of immobilised enzyme i.e. the enzyme is converting lesser amounts of substrate per time. The decrease is more pronounced for  $\alpha$ -D-glucosidase. As  $K_M$  is preserved and conformational measurements of other adsorbed proteins showed that adsorption did not induce strong conformational changes this loss of activity is not induced by disturbances of the conformation. The decreased activity is caused by different conditions during activity measurements of the immobilised and dissolved enzyme, i.e., the  $pH$  value is decreased and ionic strength is increased inside the brush. Therefore, there are different conditions for the immobilised enzymes inside the brush compared to the solution.  $pH$  value and ionic strength are converging to the condition of the solution with increasing distance to the core. Enzymes with decreased activity for lower  $pH$ -value are decreasing  $k_{cat}$ .  $\alpha$ -D-glucosidase e.g. showed no activity in the used assay for  $pH$  value lower than five. Furthermore, investigations showed that  $k_{cat}$  is dependent on the pre-treatment of the enzyme.

In this present work, it was shown that high amounts of enzymes on spherical polyelectrolyte brushes can be adsorbed. With this easy approach enzymes can be immobilised and remain

their activity. Since  $K_M$  values are preserved spherical polyelectrolyte brushes are suitable as ideal carrier particles for immobilisation.



## VII. Anhang

### VII.1 Synthese und Reinigung der Latices

#### VII.1.1 Chemikalien

Das eingesetzte Styrol (BASF) wurde zunächst vom Stabilisator befreit, indem 1 l Styrol dreimal mit jeweils 0,6 l 10 Gew.-%iger Natronlauge extrahiert wurde. Anschließend wurde mit entionisiertem Wasser neutral gewaschen und über Calciumsulfat getrocknet. Das auf diese Weise destabilisierte Styrol wurde bei reduziertem Druck (20 mbar, 45°C) destilliert. Die Reinigung der Acrylsäure (99%, Aldrich) erfolgte ebenfalls über eine Destillation (20 mbar, 42°C). Das Monomer Natrium-4-Vinyl-benzolsulfonat (NaSS, Fluka) wurde wie der Emulgator Natriumdodecylsulfat (SDS, Fluka) und der Initiator Kaliumperoxodisulfat (KPS, Fluka) ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Irgacure 2959 (2-Hydroxy-4'-hydroxyethoxy-2-methylpropiophenon) wurde freundlicherweise von Ciba Spezialitätenchemie GmbH zur Verfügung gestellt und wurde wie Methacrylsäurechlorid (Fluka) ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das bei den Synthesen bzw. Versuchen eingesetzte Wasser wurde durch Reversosmose (Millipore MilliRO) und anschließenden Ionenaustausch (Millipore MilliQ) vor jedem Experiment gereinigt. Sämtliche weitere Chemikalien wurden von VWR, Sigma, Fluka oder Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Glucoamylase aus *Aspergillus niger* (Fluka 10115),  $\alpha$ -D-Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Fluka, 70797) und  $\beta$ -D-Glucosidase aus Mandeln (Sigma G0395) wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Für die Überprüfung der ITC wurde ein fertiges Testkit bestehend aus in 50mM Kaliumacetat-Puffer gelöster RNase A bzw. 2'CMP, direkt von MicroCal, LLC bezogen und eingesetzt.

## VII.1.2 Synthese des Photoinitiators HMEM

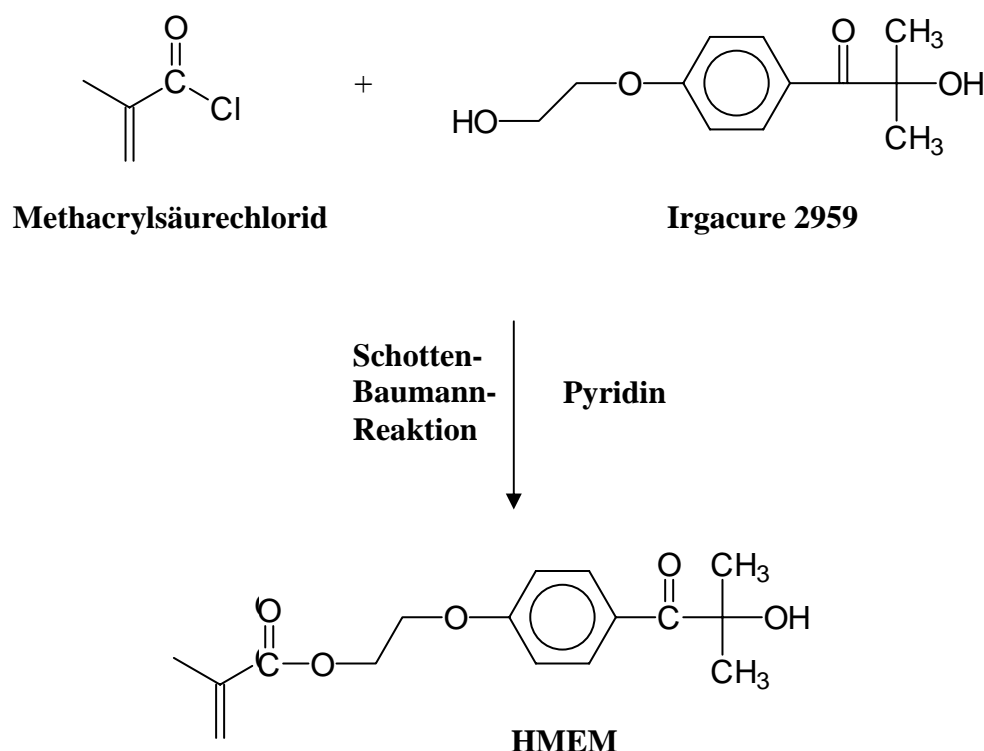
Die Darstellung des Photoinitiators HMEM (Methacrylsäure-2-[4-(2-hydroxy-2-methylpropionyl)-phenoxy]-ethylester) erfolgte nach der von Guo *et al.* (1999) entwickelten Vorgehensweise (s. Abb. VII.1). Hierbei wird von einem käuflich erwerbbaaren Photoinitiator Irgacure 2959 (Ciba) ausgegangen. Um diesen in eine polymerisierbare Form zu überführen, wird er in einer Schotten-Baumann-Reaktion mit Pyridin als Base in acetonischer Lösung umgesetzt. Über die hierbei eingeführte Vinylgruppe lässt sich der Photoinitiator HMEM durch Copolymerisation mit Styrol chemisch an die Kernoberfläche binden.

### *Experimentelle Durchführung:*

In einem 2 l Dreihalskolben mit Septum, Tropftrichter und Rückflusskühler wurden 95,01 g Irgacure 2959 in 600 ml Aceton bei 30°C (Wasserbad) gelöst. Nach vollständiger Auflösung wurden 50ml Pyridin zugegeben und mit Eis auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 43,02 g Methacrylsäure über einen Tropftrichter zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 16 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde im Vakuum um die Hälfte eingengt. Das Konzentrat wurde je achtmal mit 400 ml entionisiertem Wasser gereinigt, um das bei der Reaktion entstandene Pyridiniumsalz zu entfernen. Mittels Säulenchromatographie (Kieselgel M60) wurde die erhaltene organische Phase gereinigt, als Laufmittel diente Aceton. Die Reinigung wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Merck Aluminiumoxid 60 F254 neutral (Typ E)) überprüft. Die Hauptfraktion des Reaktionsprodukts wurde im Vakuum aufkonzentriert.

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>):

δ(ppm) = 1,53 (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OH); 1,93 (s, 3H, CH<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)-); 2,89 (s, 1H, -OH); 4,45, 4,54 (t, 4H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 5,69, 6,10 (d, 2H, CH<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)-); 7,10, 8,28 (m, 4H, -O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CO-)



**Abb. VII.1:** Synthese des Photoinitiators HMEM (Guo *et al.* 1999): Über eine Schotten-Baumann-Reaktion wird eine Vinylgruppe in den Photoinitiator eingebracht, welche dazu dient, den Photoinitiator copolymerisierbar zu machen.

### VII.1.3 Zweistufenpolymerisation zur Darstellung der PS-co-HMEM-Kernlatices

Die Synthese erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Guo *et al.* (1999, 2000). Zunächst wurden in einer Emulsionspolymerisation Polystyrol-Latices mit enger Teilchengrößenverteilung dargestellt. Die Menge des Natriumdodecylsulfat (SDS) und Kaliumperoxodisulfat (KPS) wurde so gewählt, dass Teilchen mit einem Durchmesser von ungefähr 100 nm entstanden. Durch den Einsatz von KPS als Initiator wurden gleichzeitig Sulfatgruppen in die Oberfläche eingebaut. Diese bewirken eine elektrostatische Stabilisierung des Latex.

Im ersten Reaktionsschritt wurde bei 80°C die Emulsionspolymerisation durchgeführt. Durch die kurze Reaktionsdauer von einer Stunde ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht alles Styrol komplett umgesetzt, die PS-Kerne sind dabei noch mit Styrol gequollen. Anschließend wurde die Temperatur auf 70°C abgesenkt und unter *starved conditions*, d.h. der langsamen Zugabe

von HMEM, der Photoinitiator mit dem noch nicht umgesetzten Styrol auf der Oberfläche aufpolymerisiert (Guo *et al.* 2000). So wurde eine geschlossene aus Styrol und HMEM gebildete Copolymerschicht erhalten. Dies konnte mittels Röntgenkleinwinkelstreuung nachgewiesen werden (Witte mann 2004). Durch diese Vorgehensweise wurden Latexpartikel mit definierter Kern-Schale-Morphologie erhalten, die eine enge Teilchengrößenverteilung aufwiesen. Mehr als 4 mol-% HMEM wurde nicht verwendet, da Untersuchungen von Guo *et al.* (1999) darauf hinweisen, dass so schon die maximale Dichte der Ketten auf der Oberfläche erreicht werden kann.

### *Experimentelle Durchführung:*

Die Synthese der PS-Saat erfolgte in einem 4 l Vierhalskolben. Dieser wurde mit einem Rührmotor (IKA), KPG-Rührer (Glaswelle und PTFE-Rührblatt), einem Rückflusskühler, Septum und einem Innenthermometer versehen. Mit Hilfe eines Wasserbads wurde der Reaktor temperiert.

Nach dreimaligen Entgasen und Belüften mit Stickstoff wurde Wasser, SDS und Styrol unter ständigem Rühren zugegeben. Danach wurde nochmals dreimal entgast und mit Stickstoff belüftet. Nachdem die Reaktionsmischung auf 80°C erhitzt war, wurde über ein Septum eine wässrige KPS-Lösung injiziert. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurden 100 g der Reaktionsmischung entnommen und nach Abkühlen auf 40°C über Glaswolle filtriert. Um die Photoinitiatorschicht aufzupolymerisieren, wurde die Temperatur der Reaktionsmischung auf 70°C abgesenkt. Danach wurde eine entsprechende Menge acetonischer HMEM-Lösung per Dosierapparatur (Razel) mit einer Zutropfgeschwindigkeit von 0,24 ml/min durch ein Septum injiziert. Fünf Stunden nach Beginn der ersten Photoinitiatorzugabe wurde auf 40°C abgekühlt und der synthetisierte Latex über Glaswolle filtriert.

Es wurde von jedem PS-Kernlatex und PS-co-HMEM-Kernlatex eine Probe durch Dialyse gereinigt. Der Feststoffgehalt wurde mittels Gravimetrie bestimmt. Vor dem Einsatz der PS-co-HMEM-Kernlatex in der Photoemulsionspolymerisation wurden diese mittels Ultrafiltration wie in Kap. VII.1.6 beschrieben gereinigt.

Eine Übersicht über die Reaktionsansätze ist in Tabelle VII.1 zusammengestellt. Die Informationen über die Synthese der PS-co-HMEM-Kernlatices sind in Tabelle VII.2 zusammengefasst.

**Tab. VII.1:** Einwaagemengen für die Synthese der PS-Kernlatices.

Latex	BJ-K3	BJ-K4	BJ-K5
Styrol [g]	467,47	353,53	467,52
[mol]	(4,5)	(3,4)	(4,5)
SDS [g]	6,5547	4,8941	6,5502
[mmol]	(22,73)	(16,97)	(22,72)
KPS [g]	1,8348	1,3838	1,8301
[mmol]	(6,79)	(5,12)	(6,77)
H <sub>2</sub> O [g]	1930,94	1676,02	1958,25
Reaktionstemperatur [°C]	80	80	80
Reaktionsdauer [h]	1	1	1
FG vor Reinigung [Gew.-%]	19,22	20,23	19,55
$d_{DLS}$ [nm]	102	94	95
$d_{Zetasizer}$ [nm]	102	93	96

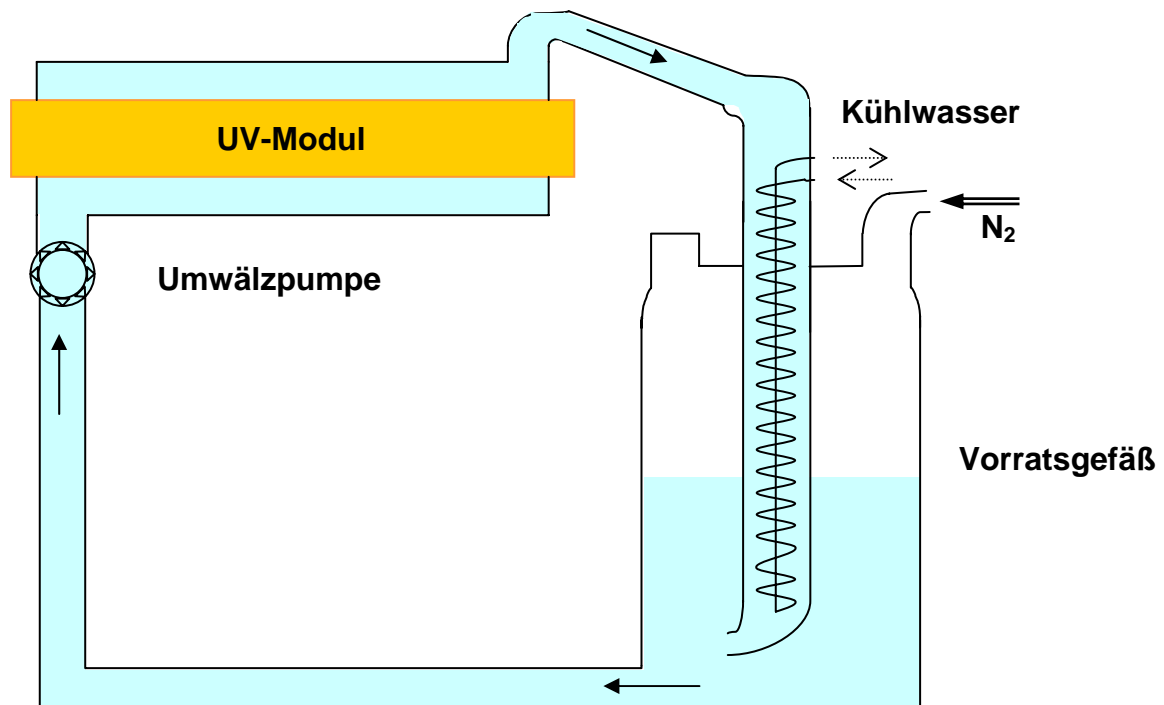
**Tab. VII.2:** Einwaagemengen bei der Synthese der PS-co-HMEM-Kernlatices.

Latex (HMEM-Gehalt)	Kp20 (2,0 mol-%)	Kp21 (2,0 mol-%)	Kp22 (2,0 mol-%)
HMEM-Lösung [g]	7,90	43,93	33,69
[mmol HMEM]	(60,32)	(60,32)	(60,32)
Reaktionstemperatur [°C]	70	70	70
Reaktionsdauer [h]	5	5	5
FG vor Reinigung [Gew.-%]	20,23	20,03	20,12
$d_{DLS}$ [nm]	102	103	104
$d_{Zetasizer}$ [nm]	105	104	105

## VII.1.4 Photoemulsionspolymerisation zur Darstellung der Kern-Schale-Latices

Die Synthese der Kern-Schale-Latices erfolgte mit Hilfe einer Photoemulsionspolymerisation. Im Unterschied zur Synthesevorschrift von Guo *et al.* (1999) wurde ein anderes Reaktorsystem (a.c.k., EnViolet Laborreaktor, s. Abb. VII.2). eingesetzt. Dieses bestand aus einer Umwälzpumpe, einem UV-Modul (auf 500 W gedrosselter 1000W Hg-Mitteldruckstrahler, Wellenlängenbereich 200 – 600 nm) und einem Vorratsgefäß mit Durchflussskühler (max. 3000 ml Reaktionsvolumen). Die Abführung der erzeugten Wärme erfolgte mittels Kühlung durch einen auf 6°C eingestellten Umwälzkühler (Haake UWK 140/TP1). Das System unterscheidet sich vom dem bisher genutzten Reaktorsystem (Heraeus TQ 150 Z3) dadurch, dass hier Vorratsgefäß und UV-Modul voneinander getrennt sind. Dadurch kann das Reaktionsvolumen von 1,5 bis 3 l variiert werden und ist nicht mehr durch das Volumen des vorherigen Reaktorsystems von 650 ml eingeschränkt. Durch den Aufbau des Reaktorsystems kann das Reaktionsgemisch jetzt an der Lampe vorbei fließen und gleichzeitig gekühlt werden. Durch eine entsprechende Elektronik des Systems können die Bestrahlungszeiten und -leistungen reproduzierbar erfolgen. Die UV-Leistung der Lampe wird durch UV-Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bestimmt.

Die als Saat eingesetzten PS-co-HMEM-Kernlatices wurden durch Ultrafiltration gereinigt. Auf diese wurde das wasserlösliche Monomer durch Saatpolymerisation polymerisiert. Für die Reaktion wurde ein Feststoffgehalt von 2,5 Gew.-% gewählt, da es für einen höheren Feststoffgehalt sonst zu Rekombinationen von wachsenden Kettenradikalen, die sich auf verschiedene Kerne befinden, kommen kann. Bei einem niedrigeren Feststoffgehalt kommt es aufgrund der zu geringen Radikalkonzentration zu keinem Schalenaufbau. Die synthetisierten Kern-Schale-Latices wurden mittels Ultrafiltration gegen entionisiertes Wasser gereinigt, um das in Lösung entstandene PAA zu entfernen.



**Abb. VII.2:** Reaktorsystem (oben) und schematische Darstellung (unten).

*Experimentelle Durchführung:*

Zuerst wurden durch Ultrafiltration gereinigte PS-co-HMEM-Kernlatices, entionisiertes Wasser und Monomer im Vorratsgefäß gemischt und viermal entgast und mit Stickstoff belüftet. Für die Synthese von KpS22 wurden 20 mol-% der eingesetzten Acrylsäure durch Zugabe von 4,1 g (102,5 mmol) Natriumhydroxid neutralisiert. Die Menge des Latex wurde so gewählt, dass ein FG von 2,5 Gew.-% vorlag. Danach wurde die Umwälzpumpe eingeschaltet und eine Probe von 5 ml entnommen. Die Reaktion wurde durch das Zünden der UV-Lampe initiiert und zur Reaktionskontrolle in bestimmten Abständen (2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten) jeweils eine Probe von 5 ml entnommen. Diese wurden dann mittels DLS untersucht und die wachsende Schalendicke  $L$  gegen die Reaktionszeit  $t$  aufgetragen (s. Abb. VII.3). Damit konnte gezeigt werden, dass der Schalen Aufbau nach ca. 20 bis 25 min abgeschlossen war und die Schalendicke konstant blieb. Der Latex wurde kontinuierlich durch die Pumpe umgewälzt. Nach der Entnahme der letzten Probe wurde die Reaktion abgebrochen. Kam Acrylsäure als Monomer zum Einsatz, wurde der Reaktionsumsatz zusätzlich mittels Gravimetrie aus den entnommenen Proben ermittelt (s. Kap. VII.3.9). Die Kern-Schale-Latices wurden mittels Ultrafiltration gegen jeweils 10 l entionisiertes Wasser gereinigt. Die Ansätze und erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen VII.3 und VII.4 zusammengefasst.

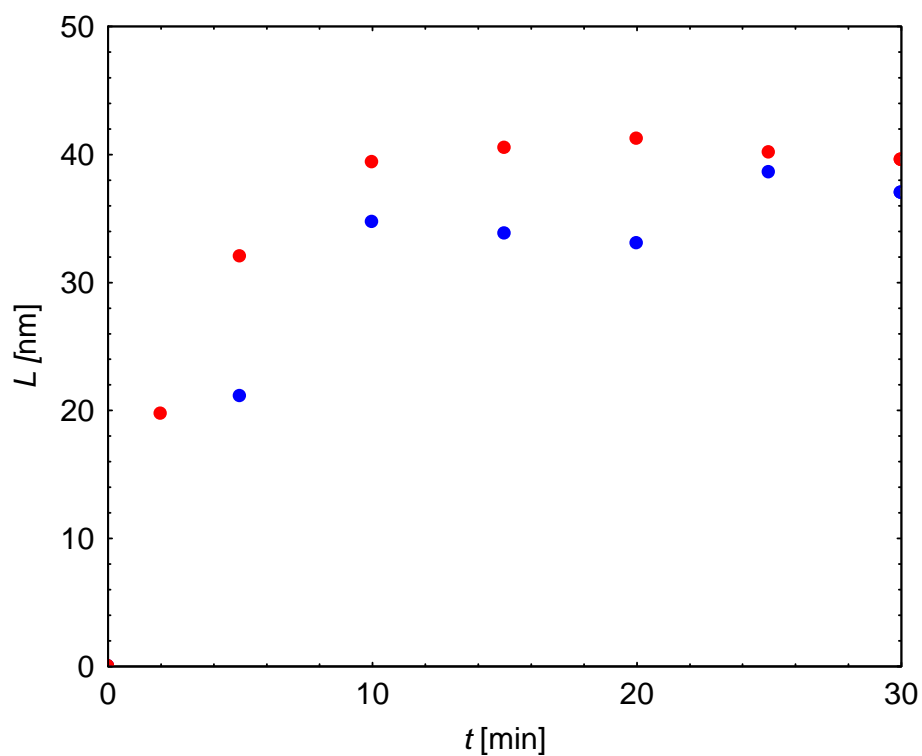
**Tab. VII.3:** Einwaagemengen der Photoemulsionspolymerisation für die Darstellung von annealed brushes.

Latex	KpS21	KpS22	KpS24	KpS25
Kern (HMEM-Gehalt)	Kp19 (4,0)	Kp19 (4,0)	Kp20 (2,0)	Kp22 (2,0)
Kern-Latex [g]	703,56	767,03	518	693,48
FG [Gew.-%]	10,66	7,77	7,1	7,21
AA [g] [mol]	11,66 (0,162)	29,6 (0,411)	24,82 (0,34)	13,8380 (0,19)
H <sub>2</sub> O [g]	2113,8	1585,3	2482	1306,52
$d_{DLS}$ [nm]	174	218	166	208
$d_{Zetasizer}$ [nm]	---	---	---	203



**Tabelle VII.4:** Einwaagemengen der Photoemulsionspolymerisation für die Darstellung von quenched brushes.

Latex	KpSS2	KpSS3	KpSS4
Kern (HMEM-Gehalt)	Kp19 (4,0)	Kp14 (4,0)	Kp20 (4,0)
Kern-Latex [g]	643,52	724,24	354,13
FG [Gew.-%]	(9,45)	(5,68)	(14,58)
NaSS [g] [mol]	35,45 (0,172)	102,69 (0,497)	54,50 (0,264)
H <sub>2</sub> O [g]	1435,0	2132,66	1998,06
$d_{DLS}$ [nm]	344	298	---



**Abb. VII.3** Aufbau der Schalendicke mit der Reaktionszeit [KpS24 (blau), KpS25(rot)]

## VII.1.5 Immobilisation von Enzymen

Für die Erstellung der Adsorptionskurven wurden zehn Proben parallel vorbereitet. Zuerst wurde Protein in die entsprechenden Glasgefäße abgewogen und dann mit Pufferlösung verdünnt. Anschließend wurde Latex zugegeben. Diese Vorgehensweise diente dazu, einen lokalen Überschuss an Protein zu verhindern. Die Latexmenge wurde so gewählt, dass dessen Feststoffgehalt 1 Gew.-% betrug. Danach wurden die Proben 24 h bei 4°C gekühlt. Dies erfolgte durch Kühlung mittels eines auf 2°C eingestellten Umwälzkühlers (Haake UWK 140/TP1). Zur Abtrennung des überschüssigen Proteins wurde eine Ultrafiltration wie in Kap. VII.1.6 beschrieben durchgeführt. Das proteinhaltige Serum wurde aufgefangen und ausgewogen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie (s. Kap. VII.3.5). Die vom überschüssigen Protein gereinigten Proben wurden gekühlt aufbewahrt.

### *Puffersysteme:*

Als Puffer wurden 2-Morpholino-ethansulfonsäure, 3-N-Morpholino-propansulfonsäure und 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure verwendet. Hierfür wurden 10 mM wässrige Pufferlösungen angesetzt und mit NaOH auf den jeweiligen *pH*-Wert eingestellt. [MES (*pH* 6,1), MOPS (*pH* 7,1), CHES (*pH* 9,3)]. Zur Vermeidung von mikrobakteriellem Befall wurde eine NaN<sub>3</sub>-Konzentration von 2 mM verwendet.

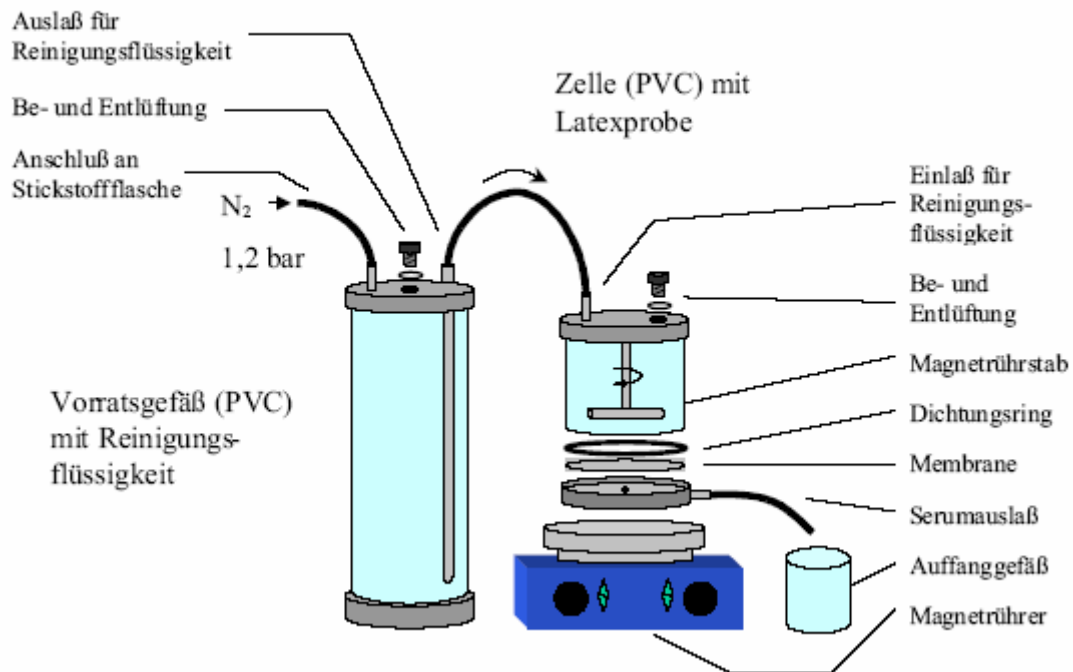
## VII.1.6 Reinigung der Latices

### *Ultrafiltration/ Serumreplacement:*

Die Latices wurden durch Ultrafiltration in einer Serumreplacementzelle (Eigenbau, siehe Abb. VII.4) gereinigt. Die Zelle hat ein Fassungsvermögen von 750 ml und in die Vorratsgefäße passen 1,8 l. Für die Reinigung wurden 400 ml Latex in die Serumreplacementzelle eingefüllt und bei einem Stickstoffüberdruck von 1,2 bar gereinigt. Dabei sollte der Feststoffgehalt des zu reinigenden Latex 10 Gew.-% nicht überschreiten. War dieser höher, so wurde mit dem entsprechenden Dispersionsmedium verdünnt.

Für PS-co-HMEM-Kernlatices wurde eine Cellulosenitrat-Membran mit einer Porenweite von 50 nm (Schleicher&Schuell) benutzt, dabei wurde die Zelle gegen Licht geschützt, um den vorzeitigen Zerfall des Photoinitiators zu verhindern. Für die restlichen Latices wurde eine

Cellulosenitrat-Membran (Schleicher&Schuell) mit einer Porenweite von 50 bzw. 100 nm verwendet.



**Abb. VII.4:** Schematische Darstellung der Ultrafiltrationszellen (Wittemann 2004).

Für die Reinigung von Kleinstmengen wurde eine kleinere Serumreplacementzelle (Eigenbau, Abb. VII.5) benutzt. Es wurde hierzu eine Cellulosenitrat-Membran (Schleicher&Schuell) mit einer Porenweite von 50 bzw. 100 nm und einem Durchmesser von 50 mm verwendet.



**Abb. VII.5:** Im Vordergrund befinden sich Ultrafiltrationszellen zur Entfernung von ungebundenen Proteinen. Im Hintergrund befinden sich die dazugehörigen Vorratsgefäße.

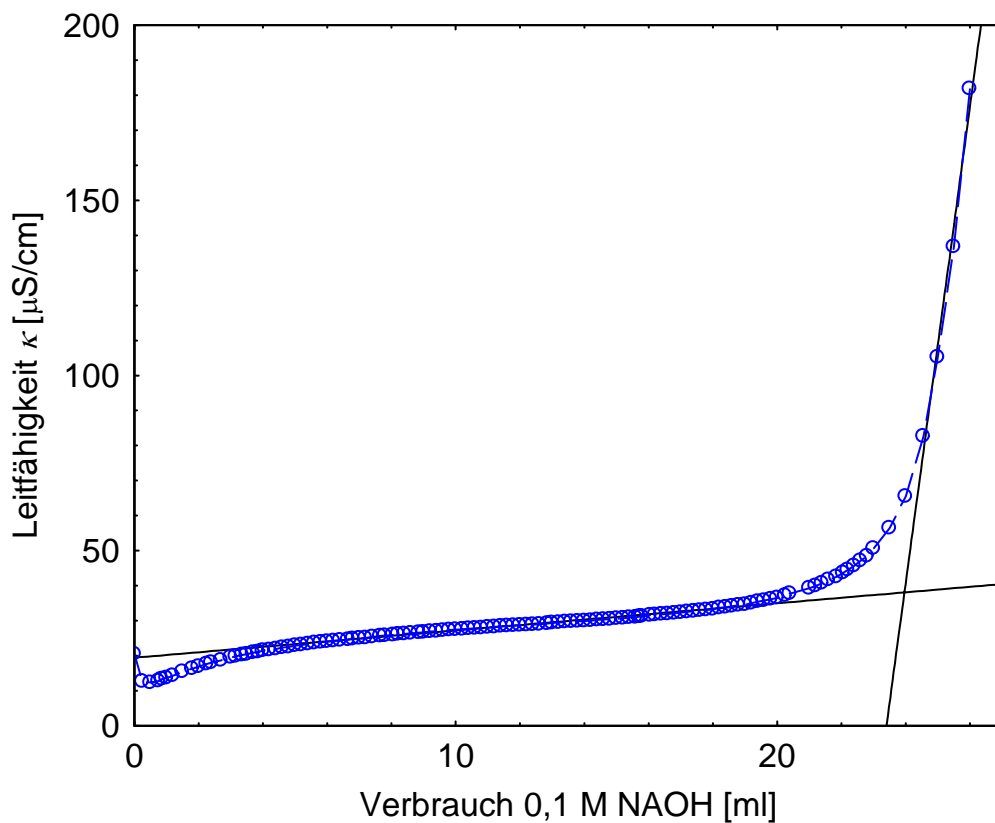
*Dialyse:*

Zur Sterilisation wurde zunächst ein aus Zellulose bestehender Dialyseschlauch (Medicell: Ausschlussgrenze 12000 – 14000 Dalton) in entionisiertem Wasser einige Stunden ausgekocht. Dieser wurde dann mit Latex befüllt, verschlossen und in ein Dialysebad mit entionisiertem Wasser überführt. Das Wasser des Dialysebades wurde täglich ausgetauscht und dessen Leitfähigkeit zur Kontrolle des Reinigungsfortschritts gemessen. Bei PS-co-HMEM-Kernlatices musste dafür gesorgt werden, dass die Proben vor Lichteinfall geschützt waren, um einen vorzeitigen Zerfall des Photoinitiators zu verhindern.

## VII.2 Charakterisierung der Trägerpartikel

### VII.2.1 Konduktometrische Titration

Die Massenzusammensetzung der *annealed brushes* wurde mittels konduktometrischer Titration der Latexproben mit 0,1 M NaOH bestimmt. Als Beispiel für die erhaltenen Titrationskurven ist die zu KpS25 gehörige Kurve in Abb. VII.6 dargestellt. Durch Bestimmung des Äquivalenzpunkts wird die Menge an PAA erhalten. Unter Berücksichtigung des Feststoffgehalts wird die Massenzusammensetzung, d.h. das Verhältnis der Masse des Kerns  $m_K$  zur Masse der Schale  $m_S$ , berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII.5 zusammengestellt.



**Abb. VII.6:** Beispiel der konduktometrischen Titrationskurve für das annealed brush System KpS25

**Tab. VII.5:** Massenzusammensetzung der Kern-Schale-Latices

Latex	KpS21-4,0	KpS22-4,0	KpS25-2,0
$m_K:m_S$	12,0:1	5,6:1	9,85:1

## VII.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die hydrodynamischen Radien der Latices konnten durch Untersuchungen mittels der dynamischen Lichtstreuung ermittelt werden. Hierbei werden die Intensitätsfluktuationen einer stark verdünnten Probe analysiert. Die Intensität des Streulichtes fluktuiert, da die thermische Bewegung der Teilchen bewirkt, dass die Streuwellen je nach momentaner Anordnung der Teilchen unterschiedlich interferieren. Da im thermischen Gleichgewicht sich kleine Teilchen schneller als größere bewegen, kann aus der Relaxationsrate der auftretenden

Intensitätsfluktuation ein Diffusionskoeffizient der Teilchen berechnet werden (Thomas 1987, Chu 1991, Wiese 1992). Aus diesen gemessenen Diffusionskoeffizienten kann über die Stokes-Einstein-Beziehung (s. Kapitel VII.3.3) der effektive hydrodynamische Teilchenradius berechnet werden. Ein Vergleich mit aus statistischen Methoden (Bsp. SAXS) ermittelten Teilchengrößen ist wegen starker Wechselwirkungen des Dispersionsmediums mit den Latices nur eingeschränkt möglich. Sämtliche DLS-Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Die Untersuchungen mittels DLS wurden zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien der PS-Kerne, der PS-co-HMEM-Latices und Kern-Schale-Latices eingesetzt (s. Tab. VII.1-4). Zur Reaktionskontrolle wurde der Schalen Aufbau durch Photoemulsionspolymerisation mittels DLS gemessen (s. Abb. VII.5).

### VII.2.3 Zetapotential

Das Zetapotential kann als Maß für die Stabilität von kolloidalen Systemen dienen. Aus der Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO)-Theorie wurde abgeschätzt, dass für Werte größer 30 mV und kleiner -30 mV die Partikel sich gegenseitig abstoßen und die Dispersion stabil ist. Liegen die Werte dazwischen, so ist die Stabilität des kolloidalen Systems nicht mehr gewährleistet (Wongsagonsup *et al.* 2005). Die Bestimmung des Zetapotentials erfolgte für PS-Latices, PS-co-HMEM-Latices und *annealed brush* Systeme (s. Kap. VII.3.8). Die Ergebnisse sind in Tab. VII.5 und VII.6 aufgeführt.

**Tab. VII.5:** Übersicht über das für die verschiedenen ungereinigten Latices gemessene Zetapotential.

Latex	BJ-K3	BJ-K4	BJ-K5	Kp20	Kp21	Kp22
Zetapotential $\zeta$ [mV]	$-41 \pm 3$	$-35 \pm 3$	$-44 \pm 3$	$-36 \pm 2$	$-35 \pm 2$	$-46 \pm 4$

**Tab. VII.6:** Übersicht über das für die verschiedenen gereinigten Latices gemessene Zetapotential.

Latex	BJ-K3	BJ-K4	BJ-K5	Kp20	Kp21	KpS25
Zetapotential $\zeta$ [mV]	$-28 \pm 2$	$-26 \pm 2$	$-27 \pm 2$	$-24 \pm 2$	$-23 \pm 2$	$-29 \pm 2$

Insgesamt sind die Partikel durch die Verwendung von KPS negativ geladen. Ungereinigte Latices sind durch SDS stabilisiert, dies ist deutlich an den Werten von unter -30mV zu erkennen. Nach der Reinigung wird diese Stabilisierung entfernt, das Zetapotential steigt. Um eine genaue Aussage über die mögliche Stabilität der Partikel zu treffen, reicht dies nicht aus. So ist ein *annealed brush* gegenüber *pH*-Wert, Ionenstärke, Scherung oder Sedimentation über weite Bereiche stabil, während gereinigte Kerne zu Agglomeraten führen.

## VII.2.4 Scheibenzentrifuge

Die Scheibenzentrifuge ist eine Analysenmethode zur Bestimmung der Teilchengrößenverteilung der Latexpartikel dar. Allerdings lieferte sie nur Ergebnisse für Kernlatices, da *brush*-Systeme zur Sedimentation neigen. Der Dichteunterschied zwischen Teilchen und Dispersionsmedium ist zu gering für eine Messung (Wittemann 2004). Für den Vergleich der Ergebnisse aus der Scheibenzentrifuge und DLS muss die Dichte der Teilchen bekannt sein. Die Ergebnisse der Scheibenzentrifuge sind in Tab. VII.7 zusammengefasst.

**Tab. VII.7:** Übersicht über die Ergebnisse der Messungen mittels Scheibenzentrifuge.

Latex	Kp19	BJ-K3	Kp20	Kp21
$d_n$ [nm]	118	90	98	99
$d_w$ [nm]	120	92	99	101
$d_{PCS}$ [nm]	122	93	99	102
$P=d_w/d_n$	1,017	1,22	1,01	1,02

## VII.3 Geräte und Untersuchungsmethoden

### VII.3.1 Konduktometrische Titration

Bei der konduktometrischen Titration wird in Abhängigkeit von der zugesetzten Reagenzmenge der Leitwert  $L$  einer Elektrolytmenge gemessen. Der Leitwert ist mit der Leitfähigkeit  $\kappa$  verknüpft.

$$L = \kappa \frac{A}{l} \quad (\text{VII-1})$$

$\kappa$ :	Leitfähigkeit [ $1/\Omega\text{cm}$ ]
$A$ :	Elektrodenfläche [ $\text{cm}^2$ ]
$l$ :	Elektrodenabstand [ $\text{cm}$ ]

Die Leitfähigkeit ist wiederum nach folgender Formel mit der Äquivalenzkonzentration  $c^*(eq)$  verknüpft:

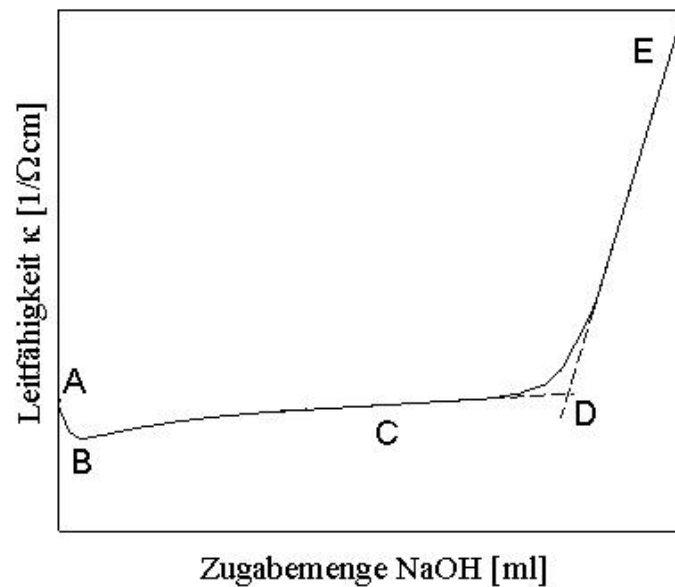
$$\kappa = F c^*(eq) u \quad (\text{VII-2})$$

$F$ :	Faradaykonstante [ $\text{As/mol}$ ]
$c^*(eq)$ :	Äquivalenzkonzentration [ $\text{mol/l}$ ]
$u$ :	Ionenbeweglichkeit [ $\text{cm}^2/\text{Vs}$ ]

Da die Leitfähigkeit proportional zur Konzentration ist, kann anhand der gemessenen Werte der Äquivalenzpunkt bestimmt werden. Hier liegt mit PAA der Fall einer schwachen Säure vor. Die für die Titration mit Natronlauge erhaltene Kurve ist in Abb. VII.7 schematisch dargestellt. Zuerst erfolgt hier eine Abnahme der Leitfähigkeit (von A nach B), da die Konzentration der  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen abnimmt. Ab Punkt B steigt die Leitfähigkeit aber wieder an, da sich das teilweise dissoziierte Na-Salz der Säure bildet. Erst wenn der Äquivalenzpunkt D erreicht ist, steigt die Leitfähigkeit aufgrund der Extraleitfähigkeit des  $\text{OH}^-$  steil an. Der Äquivalenzpunkt wird durch das Anlegen zweier Geraden CD und DE und deren gemeinsamen Schnittpunkt bestimmt (Kunze 1996).

Für die Messungen in dieser Arbeit wurden 200 ml 0,5 Gew.-%iger Latex, der mittels Ultrafiltration gegen entionisiertes Wasser gereinigt wurde, mit 0,1 M Natronlauge titriert. Während der Titration wurde Stickstoff durch die Probe geleitet, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Luft- $\text{CO}_2$  zu verhindern. Die gemessene Leitfähigkeit wurde gegen die zugegebene Menge an Natronlauge aufgetragen.





**Abb. VII.7:** Schematisches Titrationsdiagramm einer schwachen Säure

### VII.3.2 Scheibenzentrifuge (DCP)

Die Teilchengrößenverteilung der Latices konnte mittels einer Scheibenzentrifuge (Brookhaven Instruments Corporation) untersucht werden. Das Messprinzip beruht darauf, dass die Latexteilchen aufgrund ihrer Größe unterschiedlich schnell in einer Spinflüssigkeit innerhalb einer rotierenden Hohlscheibe sedimentieren. Diese werden durch turbidimetrische Analyse detektiert.

Als Spinflüssigkeit wurden 10 ml 5 Gew.-%ige wässrige Sucrose-Lösung (Fluka) verwendet, die bei einer Umdrehungszahl von 15000 U/min mit 0,8 ml einer 2 Gew.-%igen wässrigen Sucrose-Lösung überschichtet wurde. Um einen Dichtegradienten zu erzeugen, wurde die Rotation dreimal kurz (0,5 s) unterbrochen (Devon *et al.* 1991). So wird eine partielle Durchmischung von Pufferschicht und Spinflüssigkeit bewirkt. Damit werden stabile Sedimentationsbedingungen erreicht, da so das Auftreten von Verwirbelungen und Strähnenbildungen vermieden wird. Zusätzlich muss noch 0,4 ml Dodecan auf den Meniskus gegeben werden, um ein Verdampfen der Spinflüssigkeit zu verhindern.

Da die Scheibenzentrifuge nicht temperierbar ist, muss vor der Injektion der Latexprouben mindestens eine Vorlaufzeit von 30 min eingehalten werden, damit isotherme Bedingungen erhalten werden. Zur Messung wurden 0,2 – 0,3 ml einer ca. 0,2 Gew.-% Latexproube injiziert. Die Sedimentation im Zentrifugalfeld erfolgt aufgrund der höheren Dichte der Latexteilchen

gegenüber der Dichte der Spinflüssigkeit. Ausgehend von einem Gleichgewicht der auf die Teilchen wirkenden Kräfte (Reibungskraft, Zentrifugalkraft und Auftriebskraft) und der Gültigkeit des Stokes'schen Reibungskoeffizienten ( $f = 3\pi\eta\sigma$ ) ergibt sich die Stokes'sche Gleichung der Sedimentationsdauer  $t$  zu:

$$t = \frac{18\eta \ln(x_D / x_M)}{\sigma^2 \Delta\rho \omega^2} \quad (\text{VII-3})$$

$\eta$ :	Viskosität der Spinflüssigkeit
$x_D$ :	radiale Ortskoordinate des Detektors
$x_M$ :	radiale Ortskoordinate des Meniskus
$\sigma$ :	Teilchendurchmesser
$\Delta\rho$ :	Differenz zwischen Teilchen- und Spinflüssigkeitsdichte
$\omega$ :	Kreisfrequenz der DCP

Die Detektion der Teilchen erfolgt turbidimetrisch, es gilt folgende Beziehung (Devon *et al.* 1991):

$$\tau(\sigma) \sim \left( \frac{\delta\rho}{\delta\sigma} \right) \sigma^3 l_{sca}(\sigma, m) \quad (\text{VII-4})$$

$\tau(\sigma)$ :	Trübung
$(\delta\rho/\delta\sigma)$ :	differentielle Volumenverteilung
$l_{sca}(\sigma, m)$ :	normierter, integrierter Effizienzfaktor

Mit dieser Beziehung können die Teilchengröße und die Teilchengrößenverteilung der Latexpartikel berechnet werden. Die für die Auswertung benötigten Werte für  $l_{sca}(\sigma, m)$  sind in Form von Eichkurven in der Auswertesoftware für die Scheibenzentrifuge enthalten.

Die Bestimmung von Kern-Schale-Latices konnte aufgrund des geringen Dichteunterschieds zwischen Latex und Spinmedium nicht durchgeführt werden.

### VII.3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Für die dynamischen Lichtstreuemessungen zur Bestimmung der hydrodynamischen Teilchengrößen wurde ein Gerät der Firma Peters-ALV benutzt. Dieses Gerät setzt sich aus einem optischen System, das aus einem 50 mW He-Ne-Laser ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ), einer Fokussierung, einer Messzelleneinheit und einer Detektoreinheit besteht, und einem

Signalverarbeitungssystem aus Korrelator und Rechner zusammen. Der Goniometerarm, der die Photomultipliereinheit trägt, ist beweglich. So sind Messungen mit Streuwinkeln zwischen 14° und 152° möglich. Laut Herstellerangaben können Teilchen zwischen 1 nm und 1 µm bzw. Diffusionskoeffizienten zwischen  $1 \cdot 10^{-6}$  bis  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  gemessen werden.

Für die Messung wurden die Latexprouben zuerst auf eine Konzentration von ca.  $10^{-2} \text{ g/l}$  verdünnt und danach durch einen 0,45 bzw. 1 µm Polyester-Membran-Spritzenfilter (membraPure MEMBEX 25 PET) direkt in die Quarzglaszküvette filtriert. Zur Verdünnung wurde entionisiertes Wasser oder MES-Pufferlösung benutzt. Die Messküvetten wurden mit THF gereinigt und mit entionisiertem Wasser staubfrei gewaschen.

Vor jeder Messung wurden die Proben 30 Minuten in der Messzelle auf 25°C temperiert. Die Temperierung erfolgte mit einem Kryostaten (Haake C, Fisons F3). Als Indexmatchingsubstanz wurde Toluol verwendet. Da aufgrund der geringen Polydispersität der Latexpartikel keine Winkelabhängigkeit des mittleren Diffusionskoeffizienten vorliegt, wurde bei einem Streuwinkel von 90° gemessen (Norhausen 1997).

Aus den gemessenen Intensitätsfluktuationen wurden mittels der Kummulantenmethode die Diffusionskoeffizienten  $D$  ermittelt (Thomas 1987, Chu 1991, Wiese 1992). Aus diesen wurden mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung die hydrodynamischen Radien der Latexpartikel berechnet:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_{\text{eff}}} \quad (\text{VII-5})$$

$k_B$ :	Boltzmann-Konstante
$T$ :	absolute Temperatur
$\eta$ :	dynamische Viskosität
$d_{\text{eff}}$ :	effektiver (hydrodynamischer) Durchmesser

### VII.3.4 UV/VIS-Spektroskopie

In dieser Arbeit wurde ein UV/VIS-Spektrometer (Perkin-Elmer, Lambda 2S) für die Bestimmung von Extinktionskoeffizienten, Proteinkonzentrationen und für die Durchführung der Enzymtests verwendet. Es besitzt einen Messbereich von 200 (UV) bis 800 nm (VIS). Als UV-Quelle dient dabei eine Deuteriumlampe, für den Bereich des sichtbaren Lichtes wird eine Wolfram-Halogen-Lampe als Lichtquelle verwendet.

Das Messprinzip beruht darauf, dass aus einer Quelle kontinuierliches Licht durch ein Dispersionselement geleitet wird. Dieses ist immer nur für einen engen Wellenlängenbereich durchlässig. So kann der gesamte Messbereich wellenlängenabhängig abgetastet werden. Das monochromatische Licht wird nun durch die Referenz und die Probe geleitet, wobei die Intensität des Lichtes nach dem Durchgang durch die Referenz bzw. Probe mittels eines Detektors gemessen wird. Daraus wird die Absorption bestimmt. Bei dem hier verwendeten Gerät handelt es sich um ein Zwei-Strahl-Spektrometer, d. h. nach dem Monochromator wird das Licht durch rotierende Spiegel abwechselnd durch die Referenz und die Probe geleitet.

Die Temperierung des Küvettenhalters erfolgte mittels eines Kryostaten (Haake C, Fisons F3). Vor jeder Messreihe muss zudem eine Kalibrierung vorgenommen werden, um den Untergrund des Lösungsmittels zu eliminieren. Danach wird zur Kontrolle noch einmal gemessen, wobei die Werte der Absorption nur auf der 4. Dezimale abweichen dürfen. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden Quarzglasküvetten (Hellma) mit 10 mm Schichtdicke benutzt.

Für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten wurde von der Substanz eine Konzentrationsreihe im entsprechenden Lösungsmittel angesetzt und die Extinktion bei einer definierten Wellenlänge gemessen. Die gemessene Extinktion  $E(\lambda)$  wurde gegen die Konzentration in mol/l aufgetragen wurde und eine Ausgleichsgerade durch die erhaltenen Punkte gelegt. Aus der Steigung dieser Geraden wurde der molare dekadische Extinktionskoeffizient  $\varepsilon(\lambda)$  erhalten. In Tabelle VII.8 sind diese für die verwendeten Proteine und in Tabelle VII.9 für weitere verwendete Substanzen aufgelistet.

**Tab. VII.8:** Molare dekadische Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.

Protein	Wellenlänge $\lambda$ [nm]	Puffer	$\varepsilon$ [ L/(mmol*cm)]
Glucoamylase	278	10 mM MES	81,4
$\alpha$ -D-Glucosidase	255	10 mM MES	184,9
$\beta$ -D-Glucosidase	278	10 mM MOPS	76,2

**Tab. VII.9:** Molare dekadische Extinktionskoeffizienten der freigesetzten Chromophore bei der Wellenlänge  $\lambda = 405\text{nm}$ .

Substanz	$\varepsilon$ [ L/(mmol*cm)]
2-Clor-Nitrophenol (pH 6,1)	14,6
2-Nitrophenol (pH 6,1)	2,45
4-Nitrophenol (pH 7,1)	3,47

Die Konzentrationsberechnung der mittels UV/VIS-Spektroskopie untersuchten Proben erfolgte anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$E(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (\text{VII-6})$$

$E(\lambda)$ : Extinktion

$I_0$ : Intensität des in die Probe eintretenden Lichtstrahls

$I$ : Intensität des aus der Probe austretenden Lichtstrahls

$\varepsilon(\lambda)$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

$c$ : Proteinkonzentration in  $\text{mol l}^{-1}$

$d$ : Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe

### VII.3.6 Aktivitätsmessungen

Für die Messung der Enzymaktivität wurden entsprechende Enzymtests durchgeführt, deren Messung durch UV/VIS-Spektroskopie erfolgte. Generell wurden unterschiedliche Konzentrationen an Substrat hergestellt. Für die Messungen wurde 1 ml dieser Substratlösungen mit dem gleichen Volumen enzymhaltiger Lösung direkt in Quarzglasküvetten (Hellma) mit 10 mm Schichtdicke gemischt. Die Zugabe erfolgte mit einer Einkanal-Pipette (Proline, 100-1000  $\mu\text{l}$ ). Die Gesamtlösung wurde dreimal durchmischt, damit keine Störung der Messungen durch Diffusionseffekte während der Reaktion auftrat. Unmittelbar nach Zugabe der Substratlösung wurde das Messprogramm gestartet. Die Messung erfolgte zeitabhängig bei einer festen Wellenlänge von 405 nm. Die Gesamtmesszeit betrug 10 min mit Datenintervallen von einer halben Minute. Als Referenz diente die

entsprechende Pufferlösung, die Korrektur des Hintergrunds wurde wie in Kap. VII.2.5 beschrieben durchgeführt. Damit eine Auswertung möglich ist, muss die gemessene Extinktion bei 405 nm annähernd linear ansteigen. Nur so ist eine Auswertung nach Michaelis-Menten möglich. Um dies zu gewährleisten, muss zum einen die Substratkonzentration größer als die Enzymkonzentration sein, damit immer unter Sättigungsbedingungen gearbeitet werden kann. Zum anderen muss diese so gewählt werden, dass sie groß genug ist, um ein messbares Signal zu erhalten und klein genug, um nicht während der Messung den Lambert-Beer-Bereich zu verlassen. Die Latices mit adsorbiertem Enzym wurden deshalb entsprechend verdünnt. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Eine Filtration der Proben fand nicht statt, damit eine bekannte Konzentration von Enzym und Substrat vorhanden war.

### *Glucoamylase:*

Für die Aktivitätsbestimmung der Glucoamylase mit Stärke als Substrat wurde eine Farbstofflösung angesetzt. 15 g (5,31 mmol) Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat (Merck) wurden in 50 ml entionisiertem Wasser gelöst. 0,5 g (0,22 mmol) 3,5-Dinitrosalicylsäure (Fluka) wurden in 10 ml 2 M Natronlauge gelöst. Beide Lösungen wurden auf 40°C erwärmt bis alles gelöst war. Danach wurden beide Lösungen vereinigt und nach dem Erkalten mit entionisiertem Wasser auf 50ml aufgefüllt. Die Stärkelösung wurde durch Lösen von 500 mg Stärke (Fluka) in 100 ml 10mM MES-Puffer unter leichter Erwärmung hergestellt. Die Substratlösung war 2 Wochen haltbar.

Für die Bestimmung der Enzymkinetik von Glucoamylase wurde eine Konzentrationsreihe von 2-Chloro-4-Nitrophenyl-(CNP)- $\beta$ -D-Triosid in 10 mM MES-Puffer angesetzt. Für die Bestimmung des freien Enzyms wurden 3,6 mg GA in 100 ml 10 mM MES-Puffer gelöst und anschließend 1 ml dieser Lösung auf 200 ml mit 10 mM MES-Puffer verdünnt.

### *$\alpha$ -D-Glucosidase:*

Die Bestimmung der Aktivität der  $\alpha$ -D-Glucosidase wurde mit 2-Nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranosid durchgeführt. Es wurde eine Konzentrationsreihe mit 6 verschiedenen Konzentrationen angesetzt. Die Lösungen wurden mittels 10 mM MES-Puffer hergestellt.

### *$\beta$ -D-Glucosidase:*

Als Substrat für die Bestimmung der Aktivität von  $\beta$ -D-Glucosidase wurde 4-Nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranosid eingesetzt. Es wurde eine Konzentrationsreihe mit 6 verschiedenen Konzentrationen angesetzt. Die Lösungen wurden mittels 10 mM MOPS-Puffer hergestellt.

Für die Langzeitaktivitätsbestimmung wurden die gleichen Proben verwendet, die Lagerung erfolgte im Kühlschrank.

### VII.3.7 Mikrokalorimetrie

Bei der Kalorimetrie wird die Änderung der Wärme relativ zu einem Ausgangszustand gemessen und damit verschiedene thermodynamische Größen berechnet. Hier soll speziell die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) betrachtet werden. Es wird die Änderung der Wärme pro Zeiteinheit bei der Titration einer Probe mittels eines Titranten gemessen. Daraus lassen sich bei bekannter Proben- und Titrantkonzentration, Temperatur und Proben- und Titrantvolumen, thermodynamische Größen wie Enthalpie  $H$ , Entropie  $S$  und Bindungskonstante  $K_B$  ermitteln (Ladbury *et al.* 1998, 2004).

Die zu Grunde liegende Theorie soll hier erläutert werden. Nach dem Ersten Hauptsatz der Thermodynamik und der Annahme, dass nur Volumenarbeit verrichtet wird, gilt für isotherme und isobare Versuchsbedingungen (Wedler 1987):

$$dH = dq \quad (\text{VII-7})$$

Die Änderung der Enthalpie ist somit direkt mit der gemessenen Wärme verknüpft. Bei einer ITC-Messung wird allerdings die Änderung von  $dq$  pro Zeiteinheit gemessen, die durch die Injektion einer von  $\delta n_j^0$  Molen Substanz  $j$  resultiert. Betrachten wir nun, wie  $dq$  und  $\delta n_j^0$  mit den thermodynamischen Größen verknüpft ist.

Die Enthalpie ist eine Zustandsgleichung, die als Gl. VII-8 mit den Parametern Temperatur  $T$ , Druck  $p$  und Zusammensetzung  $\xi$  dargestellt werden kann:

$$H = H(T, p, \xi) \quad (\text{VII-8})$$

Wird nun das vollständige Differential gebildet, so erhält man:

$$dH = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_{p, \xi} dT + \left( \frac{\partial H}{\partial p} \right)_{T, \xi} dp + \left( \frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p, T} d\xi \quad (\text{VII-9})$$

Und unter der Voraussetzung, dass die Messung isotherm und isobar verläuft:

$$dH = \left( \frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p, T} d\xi \quad (\text{VII-10})$$

Wird nun Gl. VII-7 und VII-10 miteinander verknüpft, so wird Gl. VII-11 erhalten, in der die Messgröße  $dq$  direkt mit der Zusammensetzung  $\xi$  korreliert ist.

$$dq = \left( \frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p,T} d\xi \quad (\text{VII-11})$$

Wird Gl. VII-11 nun noch durch die weitere Messgröße  $\delta n_j^0$  geteilt wird Gl. VII-12 als zweite zentrale Gleichung der ITC erhalten.

$$\frac{dq}{dn_j^0} = \left( \frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p,T} \left[ \frac{d\xi}{dn_j^0} \right] \quad (\text{VII-12})$$

Bei einer ITC-Messung wird also  $\frac{dq}{dn_j^0}$  gemessen. Die Größe  $d\xi$  ist unbekannt. Um die Beziehung zwischen diesen beiden Größen zu ermitteln, wird ein Modell für den stattfindenden chemischen Prozess benötigt. Dies soll für die Bindung eines Liganden an eine Bindungsstelle hergeleitet werden. Die Reaktionsgleichung für diesen einfachen Fall lautet:



Wobei M für das Makromolekül und L für den Liganden steht. Die Gleichgewichtskonstante  $K'$  für diese Reaktionsgleichung lautet unter Verwendung der Aktivität  $a$  im Gleichgewicht (GG):

$$K' = \left( \frac{a[ML]}{a[M]a[L]} \right)^{GG} \quad (\text{VII-14})$$

Liegen nun am Startpunkt der Reaktion die Anfangsmenge des Makromolekül  $n^0(M)$  und des Liganden  $n^0(L)$  vor und sind im Gleichgewicht  $\xi$  mol ML gebildet worden, so wird  $n^0(M)$  und  $n^0(L)$  entsprechend erniedrigt. Zur Vereinfachung wird die Aktivität  $a$  mit der Konzentration gleich gesetzt. Damit die Gleichgewichtskonstante dimensionslos bleibt wird, ein Korrekturfaktor  $c_r = 1 \text{ mol/L}$  eingeführt. Die Gleichgewichtskonstante  $K$  ergibt sich dann nach:

$$K = \left( \frac{\frac{\xi}{V} c_r}{\left( [M]^0 - \frac{\xi}{V} \right) \left( [L]^0 - \frac{\xi}{V} \right)} \right)^{GG} \quad (\text{VII-15})$$

Daraus ergibt sich:



$$\xi^2 + \xi \left[ -n^0(M) - n^0(L) - \frac{Vc_r}{K} \right] + n^0(M)n^0(L) = 0 \quad (\text{VII-16})$$

die physikalische Lösung lautet:

$$\xi = -\frac{a}{2} - \frac{1}{2}(a^2 - 4b)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{VII-17})$$

mit  $a = n^0(M) - n^0(L) - \frac{Vc_r}{K}$

$$b = n^0(M)n^0(L)$$

Wird eine Ableitung der Gl. VII-17 nach  $n^0(L)$  durchgeführt, erhält man:

$$\frac{\partial \xi}{\partial n^0(L)} = -\frac{1}{2} \frac{\partial a}{\partial n^0(L)} - \frac{1}{2} \frac{\partial (a^2 - 4b)^{\frac{1}{2}}}{\partial n^0(L)} \quad (\text{VII-18})$$

Zur Lösung dieser Gleichung wird nun die Substitution

$$r = \frac{Vc_r}{K} n^0(M) \quad (\text{VII-19})$$

durchgeführt und es ergibt sich somit unter der Berücksichtigung, dass:

$$X_r = \frac{X_{tot}}{M_{tot}} \quad (\text{VII-20})$$

folgender Ausdruck:

$$a^2 - 4b = n^0(M) \left[ X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r^2) \right] \quad (\text{VII-21})$$

Werden nun Gl. VII-18 und VII-21 miteinander kombiniert, ergibt sich:

$$\frac{\partial \xi}{\partial n^0(L)} = \frac{1}{2} \left[ 1 + \left( \frac{1}{2} \right) \left\{ 1+r \right\} - \frac{X_r}{2} \right] - \left[ X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2 \right] \quad (\text{VII-22})$$

Nun kann man den gewonnenen Ausdruck für  $\frac{\partial \xi}{\partial n^0(L)}$  in Gl. VII-12 einsetzen und erhält:

$$\frac{dq}{dn_j^0} = \left( \frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p,T} \frac{1}{2} \left[ 1 + \left( \frac{1}{2} \right) \left\{ 1+r \right\} - \frac{X_r}{2} \right] - \left[ X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2 \right] \quad (\text{VII-23})$$

Für die Enthalpie einer idealen Lösung gilt:

$$H(aq, id) = n_1 H^*(\lambda) + (n^0(M) - \xi) H^\infty(M, aq) (n^0(L) - \xi) H^\infty(L, aq) + \xi H^\infty(ML, aq) \quad (\text{VII-24})$$

und nach  $d\xi$  abgeleitet:

$$\frac{\partial H}{\partial \xi} = H^\infty(ML, aq) - H^\infty(M, aq) - H^\infty(L, aq) = \Delta H_B^\infty(aq) \quad (\text{VII-25})$$

Wird dieses Ergebnis in Gl. VII-23 eingesetzt, so erhält man den direkten Zusammenhang zwischen den Messgrößen.

$$\frac{dq}{dn_j^0} = \Delta H_B^\infty(aq) \frac{1}{2} \left[ 1 + \left( \frac{1}{2} \right) \{1+r\} - \frac{X_r}{2} \right] - \left[ X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2 \right] \quad (\text{VII-26})$$

Da die Änderung der Wärme zwischen zwei Injektionen betrachtet wird und sich das ursprüngliche Volumen  $V_0$  ändert, ergibt sich  $\Delta q$  (i) zu:

$$\Delta q(i) = dq(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[ \frac{dq(i) + dq(i+1)}{2} \right] - dq(i-1) \quad (\text{VII-27})$$

Daraus kann dann durch Berechnung  $n$ ,  $K$  und  $\Delta H$  erhalten werden.

Da

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (\text{VII-28})$$

und

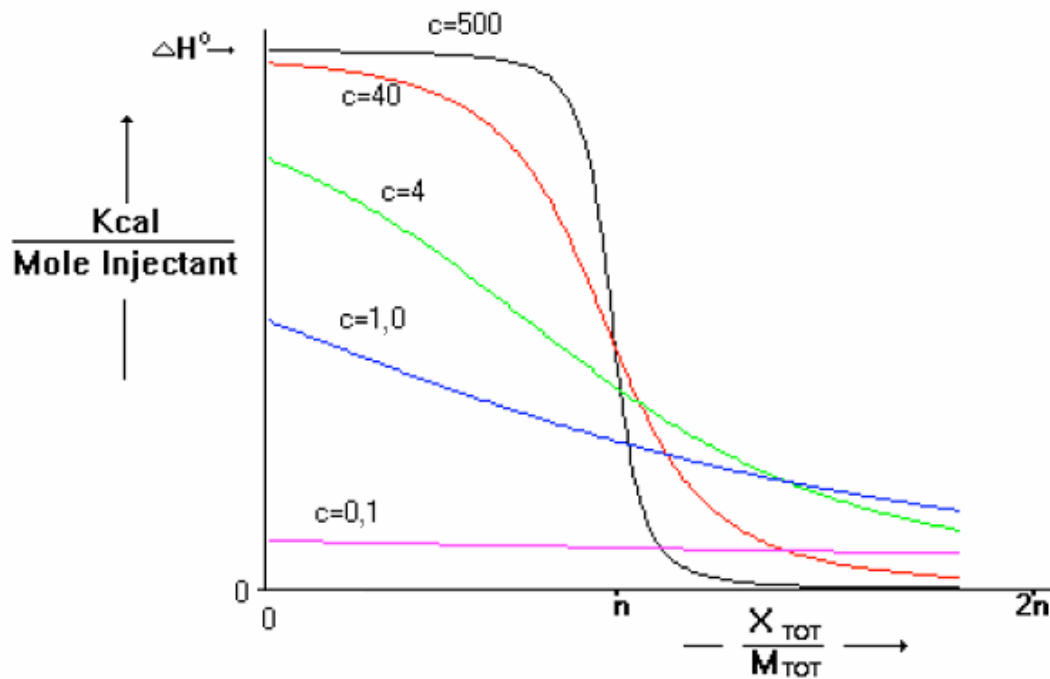
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{VII-29})$$

kann  $\Delta S$  ebenfalls berechnet werden.

Damit die Messergebnisse nach Gl. VII-27 ausgewertet werden können, müssen sie eine bestimmte Form aufweisen. Hierfür wurde der so genannte c-Faktor eingeführt.

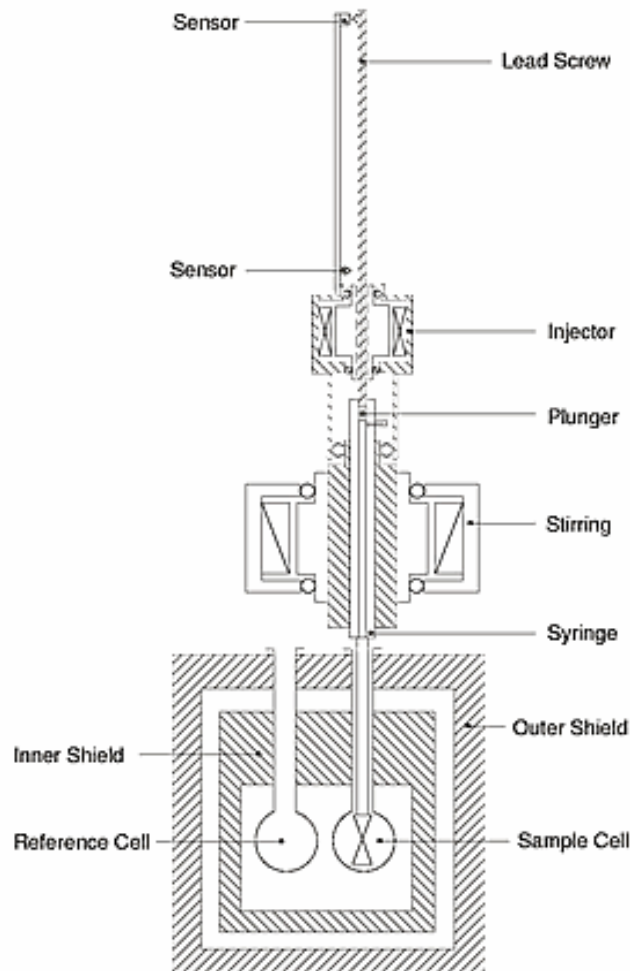
$$c = K \frac{[M]}{c_r} = \frac{1}{r} \quad (\text{VII-30})$$

In Abb. VII.8 sind die Kurvenverläufe für verschiedene c-Werte aufgetragen. Für  $c \rightarrow \infty$  werden sofort alle Bindungsstellen belegt, dadurch ist nur die Stöchiometrie und  $\Delta H$  bestimmbar. Für c-Werte kleiner fünf weichen die Kurven immer mehr vom idealen Verhalten ab, so dass die Bestimmung der Parameter nicht mehr möglich ist. Nach experimentellen Erfahrungen sollte der c-Wert zwischen fünf und 500 liegen, damit eine sinnvolle Auswertung möglich ist.



**Abb. VII.8:** Schematische Darstellung des Verlaufs der Titrationsisothermen. Für  $c$ -Werte kleiner als fünf und größer als 500 kann eine sinnvolle Auswertung der Messdaten nicht durchgeführt werden (VP-ITC Benutzerhandbuch).

In dieser Arbeit wurde ein VP-ITC (Microcal) für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen verwendet. Der Aufbau der Probenkammer und des Injektorsystems sind in Abb. VII.9 dargestellt. Die Proben wurden unter Rühren 5 Minuten zur Verringerung von Blasenbildung entgast. Die Vortemperierung erfolgte  $1^\circ\text{C}$  unter der Temperatur des durchzuführenden Experimentes. Anschließend wurde der Injektor befüllt und dreimal entleert und wieder befüllt (*purge/refill*), damit wird die Möglichkeit der Blasenbildung verringert. Die Probe wurde blasenfrei in die Messkammer mittels einer Spritze mit Kanüle eingefüllt. Der Injektor wurde in die Probenkammer eingeführt und die Messung gestartet. Es konnten Temperatur, Anzahl, Dauer und Menge der Injektionen sowie die Messzeit nach einer Injektion frei gewählt werden.



**Abb. VII.9:** Darstellung der VP-ITC Zelle und Injektors (VP-ITC Handbuch).

Für die Aktivitätsbestimmung durch Mehrfachinjektion von Substrat wurde die enzymhaltige Probe so mit Pufferlösung verdünnt, dass eine Enzymkonzentration zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  mM vorlag. Es wurden 28 Injektionen zu je 10  $\mu$ l durchgeführt. Der Abstand zwischen den Injektionen betrug 180s. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. VII.10 und Tab. VII.11 zusammengefasst.

**Tab. VII.10:** Zusammenstellung der Messergebnisse der Enzymaktivitätsuntersuchungen für native Enzyme in Lösung.

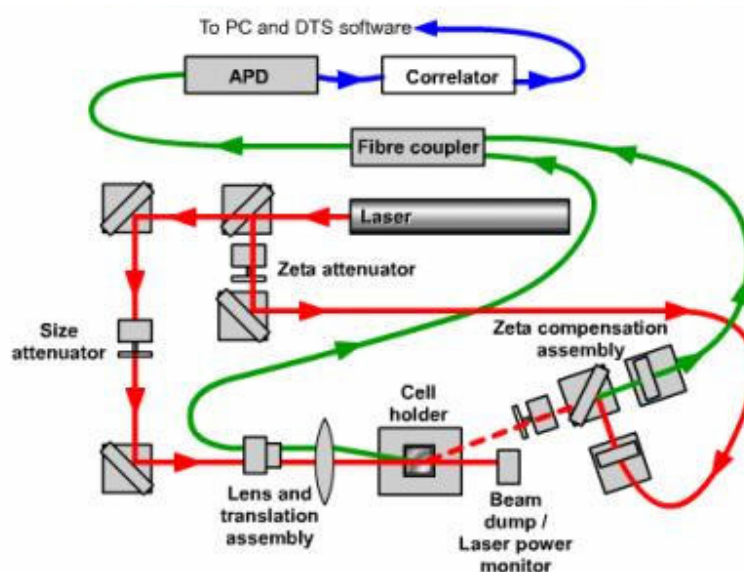
Enzym	$K_M$ [mmol/L]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]
$\alpha$ -Glu	$1,43 \pm 0,03$	$2,77 \pm 0,02$
$\alpha$ -Glu	$1,02 \pm 0,01$	$4,25 \pm 0,02$
$\beta$ -Glu	$2,13 \pm 0,04$	$4,50 \pm 0,04$
$\beta$ -Glu	$2,7 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$
$\beta$ -Glu	$3,40 \pm 0,08$	$8,80 \pm 0,09$

**Tab. VII.11:** Zusammenstellung der Messergebnisse der Enzymaktivitätsuntersuchungen für immobilisierte Enzyme.

Enzym	$\tau_{ads}$ [mg/g TP]	$K_M$ [mmol/L]	$k_{cat}$ [mmol/(g*min)]
$\alpha$ -Glu	490	$1,560 \pm 0,003$	$0,145 \pm 0,003$
$\alpha$ -Glu	490	$1,00 \pm 0,02$	$0,184 \pm 0,001$
$\beta$ -Glu	165	$6,15 \pm 0,03$	$7,20 \pm 0,02$
$\beta$ -Glu	165	$5,81 \pm 0,13$	$5,51 \pm 0,07$
$\beta$ -Glu	295	$7,26 \pm 0,04$	$13,02 \pm 0,03$
$\beta$ -Glu	295	$8,19 \pm 0,03$	$13,11 \pm 0,13$
$\beta$ -Glu	553	$4,23 \pm 0,12$	$3,04 \pm 0,04$
$\beta$ -Glu	553	$2,90 \pm 0,16$	$1,48 \pm 0,03$

### VII.3.8 Zetapotentialmessung

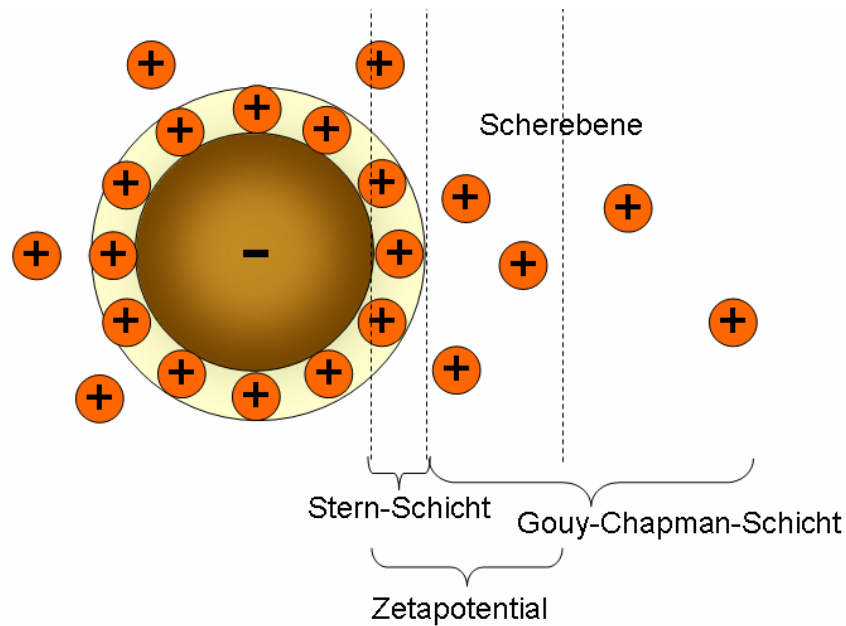
Für diese Arbeit wurde ein Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abb. VII.10 dargestellt. Als Lichtquelle diente ein 4 mW He-Ne-Laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ). Mit diesem Gerät konnten sowohl hydrodynamische Radien von Latexpartikel, als auch deren Zetapotential gemessen werden. Die Messung der Teilchenradien erfolgte durch die in Kap. VII.3.3 beschriebene DLS bei einem festen Winkel von  $173^\circ$ .



**Abb. VII.10:** Schematische Darstellung des Zetasizer Nano ZS.

#### *Zetapotential:*

Werden geladene Partikel in einem Lösungsmittel dispergiert, so lagert sich eine Schicht entgegengesetzt geladener Ionen an der Oberfläche dieser Partikel an. Ionen, die sich nahe an der Oberfläche befinden, sind dabei stark gebunden. Dies wird als Stern-Schicht bezeichnet (Winter *et al.* 1998). Weiter entfernte Ionen ergeben eine diffuse Grenzschicht (Gouy-Chapman-Schicht) (s. Abb. IV.11). Innerhalb dieser befinden sich ortsgebundene und weiter außerhalb bewegliche Ionen. Wird das Teilchen im elektrischen Feld durch die Lösung bewegt, so wird ein Teil der Ionen abgestreift. Die Grenze zwischen ortsgebundenen und beweglichen Ionen wird Abreißebene bzw. Scherebene genannt. Das Potential zwischen dieser und dem Partikel wird als Zetapotential  $\zeta$  bezeichnet.



**Abb. VII.11:** Schematische Darstellung der Ausbildung des Zetapotentials.

Zur Messung dieses Potentials wird eine Elektrophorese durchgeführt. Im elektrischen Feld  $E$  bewegen sich die Teilchen durch die elektrostatische Anziehung mit der Geschwindigkeit  $v$  in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die elektrophoretische Beweglichkeit  $\mu$  kann aus diesen beiden gemessenen Parametern berechnet werden.

$$\mu = v/E \quad (\text{VII-31})$$

Mittels der Henry-Gleichung (Henry 1931):

$$\mu = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa, a)}{3\eta} \quad (\text{VII-32})$$

mit:  $\varepsilon$ : Dielektrizitätskonstante

$\eta$ : Viskositätskoeffizient des Lösungsmittels

$f(\kappa, a)$ : Henry-Funktion

kann daraus das Zetapotential ermittelt werden. Als Wert für die Henry-Funktion wird für wässrige Lösungen und Elektrolytkonzentrationen über  $10^{-3}$ , der Wert 1,5 verwendet. Dies wird als Smoluchowski-Näherung bezeichnet (Winter *et al.* 1998). Somit ergibt sich:

$$\zeta \approx \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad (\text{VII-33})$$

Zur Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit wird die so genannte M3-PALS Technik eingesetzt. PALS steht hierbei für *Phase Analysis Light Scattering*. Hier wird nicht wie

üblicherweise die Dopplerverschiebung der Frequenz ausgenutzt, sondern die Phasenverschiebung. Aus der Messung der Phasenverschiebung im Vergleich zum Referenzstrahl kann die Geschwindigkeit der Teilchen bestimmt werden.

### *Experimentelle Durchführung:*

Für die Bestimmung der hydrodynamischen Radien von Latices wurden für die zu messenden Latices die gleiche Vorgehensweise wie für die Bestimmung mittels DLS beibehalten. Die Temperierung erfolgte durch ein Peltier-Element im Gerät. Hier wurde allerdings eine Einwegküvette (PS) verwendet. Es wurden pro Messung 5 Messläufe zu je 20 s durchgeführt. Für jede Probe wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und anschließend gemittelt. Wurden Abweichungen größer als 2-3 nm beobachtet, wurden Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Für Zetapotentialmessungen wurden Einmalmesszellen mit goldbeschichteten Elektroden verwendet. Hier musste darauf geachtet werden, dass diese blasenfrei befüllt wurden. Es wurden 30 Einzelmessungen bei 25°C durchgeführt. Es wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und anschließend gemittelt.

## VII.3.9 Bestimmung des Feststoffgehaltes

Für die Bestimmung des Feststoffgehaltes wurden zwei Proben von jeweils 2-3 g Substanz angesetzt. Dabei wurden die Präparategläser zuvor leer und erneut nach dem Befüllen mit Substanz gewogen. Danach wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 80°C getrocknet. Der Feststoffgehalt ergibt sich aus dem Verhältnis aus Gewicht der Trockensubstanz und dem Gewicht der eingewogenen Substanz. Um den Feststoffgehalt von Latex in einem Puffer-System als Dispersionsmedium zu erhalten, wurde der Feststoffgehalt des Puffer-Systems abgezogen.

## VII.4 Fehlerbetrachtung

Für die Diskussion von Messwerten ist es wichtig, den Fehler dieser Werte zu kennen. Nur so können sinnvolle Ergebnisse erhalten werden. In der statistischen Fehlerbetrachtung muss zwischen zufälligen und systematischen Fehlern unterschieden werden. Zufällige Fehler



bestimmen die Reproduzierbarkeit der Messungen, sie kommen durch apparative und subjektive Fehler zustande. Systematische Fehler bestimmen die Genauigkeit der Messungen. Deren Hauptursache sind Kalibrierungsfehler. Auch Fehler, die durch Vereinfachungen in der Auswertung oder je nach Eignung der Messmethode für das untersuchte System entstehen, gehören dazu. Sind bei den durchgeführten Messungen nicht alle Fehler zu quantifizieren, wurden diese abgeschätzt. Dies geschah auf der Basis von Mehrfachmessungen.

#### *Feststoffgehaltsbestimmung:*

Der Feststoffgehalt wird für die einzelne Latexpolprobe mindestens zweimal bestimmt. Daraus wird der Mittelwert bestimmt und eine Standardabweichung von 0,05 Gew.-% erhalten. Der Fehler der auf die Einwaage zurückzuführen ist, ist damit vernachlässigbar. Dieser Fehler nimmt mit abnehmendem Feststoffgehalt zu. Der relative Fehler liegt somit je nach Feststoffgehalt bei 0,2 % und 5 %.

#### *Scheibenzentrifuge (DCP):*

Mittels der Scheibenzentrifuge wurden von Norhausen und Weiss (Norhausen 1997, Weiss 1998) ebenfalls sterisch stabilisierte Latices bezüglich ihrer Teilchengröße und Teilchengrößenverteilung hin untersucht. Die Abschätzung des relativen Fehlers der Teilchengrößen und der Teilchengrößenverteilung wurde in diesen Arbeiten mit etwa 5 % abgeschätzt.

#### *Dynamische Lichtstreuung (DLS):*

Fehler bei den durchgeführten Messungen können durch Abweichungen von der Messtemperatur, durch Agglomeratanteile im Latex und durch Mehrteilchendiffusion entstehen. Zudem kann wegen der Polydispersität der Latices ein Fehler durch die Messung bei einem festen Streuwinkel resultieren. Da die Latices intensiv gereinigt und zur Probenvorbereitung filtriert wurden, können Fehler durch Agglomeratbildung ausgeschlossen werden. Da bei der Messung von Latexpolproben für unterschiedliche Konzentrationen keine Konzentrationsabhängigkeit auftrat, kann von einer Einteilchendiffusion ausgegangen werden. Durch Messungen mit der Scheibenzentrifuge konnte gezeigt werden, dass eine enge Teilchengrößenverteilung vorliegt. Somit sollte es bei der Auswertung der Messdaten bei

festem Streuwinkel mit der Kummulantenmethode nur zu geringfügigen Abweichungen kommen. Als Hauptfehlerquelle bleibt die Temperierung der Messzelle übrig.

Für PS- und PS-co-HMEM-Kerne kann von einem Fehler von 1 nm ausgegangen werden. Bei Kern-Schale-Latices beträgt der Fehler 3 bis 4 nm.

### *UV/VIS-Spektroskopie:*

Für die Bestimmung der Menge auf den *brushes* adsorptiv immobilisierter Proteine wurde die Extinktion des freien Proteins in Lösung bestimmt (s. VII.3.4), welches zuvor mittels Ultrafiltration abgetrennt wurde. Daraus wird die adsorbierte Menge indirekt durch Differenzbildung mit der eingesetzten Menge berechnet. Messfehler der Extinktion sind hierbei gegenüber möglichen Verlusten an Protein vernachlässigbar. Dies kann durch Adsorption an der Ultrafiltrationszelle oder auf der Membrane geschehen. Wittemann (2004) berücksichtigte diesen Effekt durch eine empirische Korrektur. Die Angabe eines Absolutfehlers gestaltet sich schwierig, da dieser vom verwendeten System und den Bedingungen während der Adsorptionsexperimente abhängig ist. Gerade für eine schwache Bindung des Proteins sind die Ergebnisse stark von äußeren Einflüssen abhängig. Als Anhaltspunkt für den experimentellen Fehler können die Fehlerangaben aus den Anpassungen der Adsorptionskurven herangezogen werden.

### *Aktivitätsbestimmung:*

Für die Bestimmung der Enzymaktivität mittels UV/VIS-Spektroskopie gilt ebenso, dass gerätebedingte Fehler im Vergleich zu den experimentellen vernachlässigbar sind. Für die Auswertung wird von einem linearen Verlauf, d.h. von einer konstanten Reaktionsgeschwindigkeit, ausgegangen. Die erhaltene Reaktionsgeschwindigkeit ist mit einem gewissen Fehler behaftet, da die experimentellen Daten von diesem idealen Verhalten abweichen. Ursache hierfür ist, dass die Substratkonzentration durch Verbrauch während der Reaktion sinkt. Doppelmessungen für immobilisierte Enzyme zeigten, dass sich die Werte für Messungen unter gleichen Bedingungen reproduzieren ließen. Hauptfehlerquellen für die Bestimmung von  $K_M$  sind die Aufnahme von nur wenigen Messpunkten und die anschließende Anpassung mittels Michaelis-Menten-Kinetik. Der Fehler von  $K_M$  wurde empirisch aus verschiedenen Messungen abgeschätzt. Für Glucoamylase betrug dieser 3 mmol/L. Der absolute Fehler für  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucosidase wurde mit 0,1 mmol/L bzw. 1 mmol/L abgeschätzt.

Durch die Messungen mittels ITC wurden eine große Anzahl Messpunkte aufgenommen, dadurch liefert die Anpassung einen kleineren Fehler des  $K_M$ -Wertes. Auch hier wurde der Fehler durch Mehrfachbestimmungen abgeschätzt.

Die Fehlerangabe von  $k_{cat}$  gestaltet sich schwierig, da hier eine Vielzahl von Faktoren einfließt.  $K_{cat}$  ist von adsorbierter Menge an Enzym  $\tau_{ads}$ , Feststoffgehalt des Latex, Verdünnungsfaktor der Probe und gemessener Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  abhängig. Für Aktivitätsbestimmungen mittels ITC muss zusätzlich der Einfluss von  $\Delta H_{app}$  betrachtet werden.  $\Delta H_{app}$  wurde durch Mehrfachmessungen bestimmt und zeigte größere Schwankungen, d.h. es ist mit einem größeren experimentellen Fehler behaftet. Zudem ist der Wert für  $k_{cat}$  sehr von äußeren Faktoren und der Vorbehandlung des Enzyms abhängig. Dadurch wurde eine beträchtliche Streuung der Messwerte erhalten.

### *Zetasizer:*

Mit Hilfe des Zetasizer Nano ZS wurde sowohl die hydrodynamischen Radien  $R_H$  von Latices als auch deren Zetapotential bestimmt. Es wurden mindestens jeweils drei Messungen pro Probe durchgeführt und der Mittelwert dieser Messungen ermittelt. Der Fehler von  $R_H$  war in der gleichen Größenordnung wie für die Bestimmung mittels DLS. Die absoluten Werte für  $R_H$  waren innerhalb der Fehlertoleranzen identisch mit den Ergebnissen aus der DLS.

Für die Bestimmung des Zetapotentials wurden ebenfalls mindestens drei Messungen pro Probe durchgeführt. Der relative Fehler lag bei 10%. Dies ist in Einklang mit der Fehlerangabe des Herstellers.

## VIII. Literatur

- Alexander, S.; Chaikin, P. M.; Grant, P.; Morales, G. J.; Pincus, P. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 5776.
- Arica, M. Y.; Alaeddinoglu, N. G.; Hasirei, V. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1998**, *22*, 152.
- Balabushevitch, N. G.; Sukhorukov, G. B.; Moroz, N. A.; Volodkin, D. V.; Larionova, N. I.; Donath, E.; Möhwald, H. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *76*, 207.
- Bahar, T.; Tuncel, A. *React. Funct. Polym.* **2000**, *44*, 71.
- Baskin, A.; Norde, W. Eds. *Physical Chemistry of Biological Interface*, Marcel Dekker: New York, **1999**.
- Bianconi, M. L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18709.
- Biesheuvel, P. M.; Wittemann, A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4209.
- Bisswanger, H. *Enzymkinetik Theorie und Methoden*, Wiley-VCH-Verlag, 3. Auflage, **2000**.
- Buchholz, K.; Kaschke, V. „*Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*“, Wiley-VCH-Verlag **1997**.
- Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153.
- Caruso, F.; Dieter Trau, D.; Helmuth Möhwald, H.; Renneberg, R. *Langmuir* **2000**, *16*, 1485.
- Caruso, F.; Fiedler, H.; Haage, K. *Colloid Surface A* **2000**, *169*, 287.
- Caruso, F.; Schüler, C. *Langmuir* **2001**, *16*, 9595.
- Chiba, S. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 1233.
- Christensen, U. *Biochem. J.* **2000**, *349*, 623.
- Christensen, T.; Svensson, B.; Sigurskjold, B. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6300.
- Chow, C.-K.; Palecek, S. P. *Biotechnol. Progr.* **2004**, *20*, 449.
- Chu, B.; *Laser light scattering*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press London, **1991**.
- Copeland, R. A. *Enzymes, A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*; Wiley-VCH: New York, **2000**.
- Coutinho, P. M.; Dowd, M K.; Reilly, P. J. *Proteins* **1997**, *28*, 162.
- Currie, E. P. K.; Sieval, A. B.; Avena, M.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R.; Cohen, Stuart M. A. *Macromolecules* **1999**, *30*, 8447.

- Czeslik, C.; Winter, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 235.
- Czeslik C. *Z. Phys. Chem.* **2004**, *218*, 771.
- Czjzek, M.; Cicek, M.; Zamboni, V.; Burmeister, W. P.; Bevan, D. R.; Henrissat, B.; Esen, A. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 37.
- Daoud, M.; Cotton, J. P. *J. Physique* **1982**, *43*, 531.
- Das, B.; Guo, X.; Ballauff, M. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **2002**, *121*, 34.
- Dautzenberg, H.; Karibyants, N.; Taitsev, S. Y. *Macromol. Rapid Comm.* **1997**, *18*, 175.
- Dautz, K.; Waldmann, H. Eds. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis– A Comprehensive Handbook*, VCH, **1995**.
- Decher, G.; Hong, J.D.; Schmitt, J. *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 831.
- Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232.
- Decker, C. H.; Visser, J.; Schreier, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 157.
- De Gennes, P. G. *J. Physique* **1976**, *37*, 1443.
- Devon, M.; Meyer, E.; Provder, T.; Rudin, A. Weiner, B. B.; *ACS Symp. Ser.* **1991**, *472*, 155.
- Dingenouts, N.; Merkle, R.; Guo, X.; Narayanan, T.; Goerigk, G.; Ballauff, M. *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 578.
- Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Caruso, F.; Davis, S. A.; Möhwald, H. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, *37*, 2201.
- Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C. *Eur. Polym. J.* **2001**, *37*, 435.
- Grover, A. K.; MacMurchie, D. D.; Cashley, R. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *482*, 98.
- Guo, X.; Weiss, A.; Ballauff, M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6043.
- Guo, X.; Ballauff, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 8719.
- Guo, X.; Ballauff, M. *Phys. Rev. E* **2001**, *64*, 051406.
- Fleck, C. C.; von Grünberg, H. H. *Phys. Rev. E* **2001**, *63*, 061804.
- Halperin, A.; Tirell, M.; Lodge, T. P. *Adv. Polym. Sci.* **1992**, *100*, 31.
- Handa, T.; Hirose, A.; Yoshida, S; Tsuchiya, H. *Biotech Bioeng* **1982**, *24*, 1639.
- Hariharan, R.; Biver, C.; Mays, J.; Russel, W. B. *Macromolecules* **1998**, *31*, 7506.
- Hartmeier, W. *Immobilisierte Biokatalyse - Eine Einführung*, Springer Verlag: Berlin **1986**.
- He, S.; Withers, S. G. *Journal of biological chemistry* **1997**, *272*, 24864.
- Henkel, E.; Morich, S.; Henkel, R. *J. Clin. Chem. Clin. Bio.* **1984**, *22*, 489.
- Henry, D.C. *Proc. R. Soc. Lond.* **1931**, *A133*, 103.
- Jackler, G.; Steitz, R.; Czeslik, C. *Langmuir* **2002**, *18*, 6565.
- Jeon, S. I.; Lee, L. H.; Andrade, J. D.; de Gennes, P. G. *J. Colloid Interf. Sci.* **1991**, *142*, 149.

- Jusufo, A.; Likos, C. N.; Löwen, H. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 11011.
- Kacar, Y.; Yakup Arica, M. *Food Chem.* **2001**, *75*, 325.
- Kaper, T.; Brouns, S. J. J.; Geerling A. C. M.; de Vos, W. M.; van der Oost, J. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 461.
- Kawaguchi, H. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1171.
- Kelly, C. E.; Fogarty, W. M. *Process Biochem.* **1983**, *18*, 6.
- Krasikov, V. V.; Karelov, D. V.; Firlov, L. M. *Biochemistry (Moscow)* 2001, *66*, 332.
- Krisdhasima, V.; Vinaraphong, P.; McGuire, J. *Colloid Interf. Sci.* **1993**, *161*, 325.
- Kumar, S., Satyanarayana, T. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 936.
- Kunze, U. R.; Schwed, G. *Grundlagen der qualitativen und quantitativen Analyse*“ 4.Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York **1996**.
- Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z. Eds. *Biocalorimetry – Applications of Calorimetry in the Biological Science*, John Wiley & Sons New York, **1998**.
- Ladbury, J. E.; Doyle, M. L. Eds. *Biocalorimetry 2 – Applications of Calorimetry in the Biological Science*, John Wiley & Sons Ltd. New York, **2004**.
- Lee, J. H.; Joon, J.-Y.; Kim, W.-S. *Biomed. Chromatogr.* **1998**, *13*, 330.
- Lodge, J. A.; Maier, T.; Liebl, W.; Hoffmann, V.; Strater, N. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19151.
- Ligoure, C.; Leibler, L. *Macromolecules* **1990**, *23*, 5044.
- Lottspeich, F.; Zorbas, H., *Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg Berlin, **1998**.
- Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *Thin solid Films* **1996**, *284-285*, 797.
- Lvov, L.; Antipov, A. A.; Mamedov, A.; Möhwald, H.; G. B. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 125.
- Lvov, Y.; Caruso, F. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4212.
- Norde, W. Lyklema, J.; *J. Colloid Interf. Sci.* **1978**, *66*, 257.
- Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Biotechnol. Progr.* **2002**, *18*, 629.
- Matsumura M.; Hirata, J.; Ishii, S.; Kobayashi, J. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1988**, *42*, 51.
- Mattheus de Roode, B.; Franssen, M. C. R.; Van Der Padt, A.; Boom, R. M. *Biotechnol. Progr.* **2003**, *19*, 1391.
- Meier-Koll, A. A.; Fleck, C. C.; von Grünberg, H. H. *J. Phys. – Condens. Mat.* **2004**, *16*, 6041.
- Meyer, H.-P.; Canevascini, G. *Appl. Environ. Microb.* **1981**, *41*, 924.
- Müller, R.H. *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1996**.

- Norhausen, C. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH) **1997**.
- O'Donnell, A. H.; Yao, X.; Byers, L. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1703, 63.
- Oh, J.-T.; Kim, J.-H. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 356.
- Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Liang, M. N.; Meluleni, G.; Pier, G.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, 17, 6336.
- Pincus, P. *Macromolecules* **1991**, 24, 1912.
- Robyt, J. F.; Whelan, W. J. *Anal. Biochem.* **1972**, 45, 510.
- Rosenfeldt, S.; Wittemann, A.; M. Ballauff; Breining, E.; Bolze, J.; Dingenouts, N. *Phys. Rev. E* **2004**, 70, 061403.
- Saha, B.C.; Zeikus, J.G. *Starch* **1989**, 2, 57.
- Saha, B. C.; Bothast, R. J. *Appl. Environ. Microb.* **1996**, 62, 3165.
- Saito, K. *Sep. Sci. Tech.* **2002**, 37, 535.
- Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstor, P., Svensson, B. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1543, 275.
- Schwinté, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Szalontai, B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 11906.
- Siiman, O.; Burshteyn, A.; Insausti, M. E. *J. Colloid Interf. Sci.* **2001**, 234, 44.
- Siro, M. R.; Lovgren T. *Acta Chem. Scand. B* **1978**, 32, 447.
- Sorimachi, K., Le Gal-Coeffet, M. F., Williamson, G., Archer, D. B., Williamson, M. P. *Structure* **1997**, 5, 647.
- Stellmach, B.; Gottschick, W.; Battermann, F.; Zabel, K. *Bestimmungsmethoden Enzyme*, Steinkopff Verlag, Darmstadt, **1988**.
- Sun, Y.; Yu, C.; Liang, H.; Chen, J. *J. Dispersion Science and Technology* **1999**, 20, 907.
- Tardioli, P. W.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. *Biotechnol. Progr.* **2003**, 19, 565.
- Thomas, J. C. *J. Colloid Interf. Sci.* **1987**, 117, 187.
- Todd, M. J.; Gomez, J. *Anal. Biochem.* **2001**, 296, 179.
- Tsuneda, S.; Shinano, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T. *Biotechnol. Progr.* **1994**, 10, 76.
- Tümtürk, H.; Caykara, T.; Sen, M.; Güven, O. *Radiat. Phys. Chem.* **1999**, 55, 713.
- van Roon, J. L.; Joerink, M.; Rijkers, M. P. W. M.; Tramper, J.; Schroen, C. G. P. H.; Beftink, H. H. *Biotechnol. Progr.* **2003**, 19, 1510.
- Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, **1987**.
- Weiss, A. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH), **1998**.

- Wenisch, E., Schneider, P., Hansen, S. A., Rezzonico, R., Righetti, P. G. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1993**, 27, 199.
- Wertz, C. F.; Santore, M. M. *Langmuir* **2001**, 17, 3006.
- Wertz, C. F.; Santore, M. M. *Langmuir* **2002**, 18, 706.
- Wertz, C. F.; Santore, M. M. *Langmuir* **2002**, 18, 1190.
- Williamson, G.; Belshaw, N.J.; Williamson, M.P. *Biochem. J.* **1992**, 282, 423.
- Winter, R.; Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, B. G. Teubner Stuttgart, **1998**.
- Wittemann, A.; Haupt, B.; Ballauff, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 1671.
- Wittemann, A. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH), **2004**.
- Wittemann, A.; Ballauff, M. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2813.
- Witten, T. A.; Pincus, P. A. *Macromolecules* **1986**, 19, 2509.
- Wiese, H. *GIT Fachz. Lab.* **1992**, 10 1029.
- Wongsagonsupa, W.; Shobsngobb, S.; Oonkhanondc, B.; Varavinita, S. *Starch/Stärke* **2005**, 57, 32.
- <http://www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>
- Xia, J.; Mattison, K.; Romano, V.; Dubin, P. L.; Muhoberac, B. B. *Biopolymers* **1997**, 41, 359.



## IX. Abkürzungen und Symbole

AA	Acrylsäure
ASAXS	Anormale Röntgenkleinwinkelstreuung ( <i>Anomalous Small Angle X-Ray Scattering</i> )
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> - Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BSA	Rinderserum Albumin
CD	Circulardichroismus
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
CNP	2-Chloro-4-Nitrophenyl
DCP	Scheibenzentrifuge
DLS	dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek
GA	Glucoamylase
$\alpha$ -Glu	$\alpha$ -D-Glucosidase
$\beta$ -Glu	$\beta$ -D-Glucosidase
FG	Feststoffgehalt
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
HMEM	Methacrylsäure-2-[4-(2-hydroxy-2-methyl-propionyl)-phenoxy]-ethylester
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
KPS	Kaliumperoxodisulfat
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
NADPH	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaSS	Natrium-4-vinyl-benzolsulfonat
PAA	Polyacrylsäure
PALS	<i>Phase Analysis Light Scattering</i>
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PS	Polystyrol
PSS	Polystyrolsulfonat
RNase A	Ribonuklease A

SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung ( <i>Small Angle X-Ray Scattering</i> )
SPB	<i>spherical polyelectrolyte brush</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TP	Trägerpartikel
TRIS	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
VP	4-Vinylpyridin

## Verzeichnis der Publikationen

*„Fixation of proteins onto the surface of functionalized polymer particles.“*

Wittmann, A.; Haupt, B.; Guo, X.; Ballauff, M. in *DECHEMA Monographien*, Vol. 137 (7th International Workshop on Polymer Reaction Engineering), VCH Verlag GmbH Weinheim, 2001.

*„Adsorption of proteins on spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution.“*

Wittmann, A.; Haupt, B.; Ballauff, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 1671.

*„High Activity of Enzymes Immobilized in Colloidal Nanoreactors“*

Neumann, Th.; Haupt, B.; Ballauff, M. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 13.

*„Activity of Enzymes Immobilized in Colloidal Spherical Polyelectrolyte Brushes“*

Haupt, B.; Neumann, Th.; Wittmann, A.; Ballauff, M. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 948.

## Lebenslauf:

geb. am 8.11.1974 in Karlsruhe

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

<b>Ausbildung</b>	1981-1985	Grundschule Forst
	1985-1994	Copernicus-Gymnasium Philippsburg
	1994	Abitur
	1994-2001	Universität Karlsruhe (TH)
	Februar 2001:	Diplom
	15.3.2001 – 31.3.2004	wissenschaftlicher Angestellter der Universität Karlsruhe (TH)
	1.4.2004-	wissenschaftlicher Angestellter der Universität Bayreuth

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 08. 07. 05

Björn Haupt